

Aus dem Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie  
Bad Langensalza GmbH

# Therapie equiner Sarkoide unter Verwendung dendritischer Zellen

- Eine klinische Studie -

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabine Bischoff

Tierärztin  
aus Potsdam

Berlin (2009)  
Journal Nr. 3213



Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Priv. - Doz. Dr. Falko Steinbach  
Zweiter Gutachter: Priv. - Doz. Dr. Jakob Walter  
Dritter Gutachter: Univ. - Prof. Dr. Dr. Arthur Grabner

Deskriptoren (nach CAB - Thesaurus):

horses, horse diseases, skin diseases, sarcoid, dendritic cells  
(MeSH), immunotherapy, antineoplastic agents.

Tag der Promotion: 03.12.2008



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Definition des equinen Sarkoids . . . . .	3
2.2	Vorkommen . . . . .	3
2.3	Lokalisierung . . . . .	4
2.4	Ätiologie . . . . .	4
2.4.1	Papillomviren als Ursache für equine Sarkoide . .	5
2.4.2	Dispositionen für equine Sarkoide . . . . .	8
2.5	Übertragung . . . . .	9
2.6	Klassifikation und klinisches Bild equiner Sarkoide . . .	9
2.6.1	Pathologisch-anatomische Diagnose . . . . .	10
2.6.2	Histopathologische Diagnose . . . . .	11
2.7	Differentialdiagnosen . . . . .	13
2.7.1	Tumore . . . . .	13
2.7.2	Tumorähnliche Neubildungen . . . . .	17
2.8	Prognose . . . . .	19
2.9	Therapie . . . . .	20
2.9.1	Invasive Therapieformen . . . . .	20
2.9.2	Nicht-invasive Therapieformen . . . . .	25
2.10	Immuntherapie . . . . .	29
2.10.1	Immunmodulatoren . . . . .	30
2.10.2	Autologe Vakzine . . . . .	33
2.10.3	Zellbasierte Immuntherapie von Tumoren . . . . .	33
2.11	Zielstellung . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>45</b>
3.1	Patienten . . . . .	45
3.2	Allgemeine Beschreibung der Therapie . . . . .	47

3.3	Anamnese und klinische Untersuchung . . . . .	48
3.3.1	Chirurgische Entfernung der equinen Sarkoide . .	48
3.3.2	Postoperative Versorgung . . . . .	50
3.3.3	Histopathologische Untersuchung . . . . .	50
3.4	Methode der Vakzine-Herstellung . . . . .	51
3.4.1	Blutentnahme . . . . .	51
3.4.2	Zellisolierung, Kultivierung . . . . .	52
3.4.3	Tumoraufbereitung . . . . .	54
3.4.4	Fertigstellung der Vakzine . . . . .	54
3.4.5	Vakzinierung . . . . .	55
3.5	Geräte und Substanzen . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Ergebnisse der Vakzine-Herstellung . . . . .	57
4.1.1	Zellisolierung und Kultivierung . . . . .	57
4.1.2	Tumoraufbereitung und Vakzine-Fertigstellung .	57
4.2	Klinische Untersuchung der Patienten . . . . .	58
4.2.1	Klinisch-anatomische und histopathologische Be- schreibung der Sarkoide . . . . .	59
4.2.2	Wundheilungsverlauf . . . . .	63
4.2.3	Nebenwirkungen . . . . .	63
4.2.4	Therapieverlauf . . . . .	64
4.3	Beispiele der behandelten Patienten . . . . .	69
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>89</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Sarkoide sind die bei Pferden am häufigsten vorkommenden Hauttumore. Die equinen Sarkoide wurden erstmalig durch Jackson (Jackson, 1936) als lokal aggressive fibroblastische Hauttumore beschrieben und können alle Einhufer (Equiden) betreffen. Sarkoide können zur Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der erkrankten Tiere führen und sind aufgrund ihrer Lage und Ausdehnung häufig mit einer Nutzungseinschränkung verbunden. Es existieren verschiedene Therapiemethoden die jedoch hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Sicherheit erhebliche Mängel aufweisen. In der veterinär- und humanmedizinischen Forschung wird seit vielen Jahren intensiv nach geeigneteren Verfahren gesucht, verschiedene Arten von Tumoren zu behandeln. Ein neuer und besonders vielversprechender Ansatz besteht in der Immuntherapie, beispielsweise durch die Verwendung autologer dendritischer Zellen. Erste humanmedizinische Studien wurden dazu Mitte der 90-er Jahre des vergangenen Jahrhunderts durchgeführt.

Die vorliegende klinische Arbeit beschreibt die Therapie equiner Sarkoide durch die Kombination der chirurgischen Entfernung der Tumore und die anschließende Applikation einer auf autologen dendritischen Zellen basierenden Vakzine. Ziele der Arbeit waren der Nachweis der Sicherheit der neuen Methode sowie die Überprüfung des Auftretens von Nebenwirkungen im Rahmen einer ersten klinischen Studie.

Im folgenden Kapitel 2 werden die Grundlagen der Ursachen der Erkrankung, ihre Diagnostik und die in der Literatur beschriebenen Therapiemethoden dargestellt. Die Therapie mittels autologer dendritischer Zellen bildet dabei einen Schwerpunkt. Die Einzelheiten und speziellen Ausprägungen der angewendeten Therapie, basierend auf autologen

dendritischen Zellen, werden im Kapitel Material und Methoden (Kapitel 3) detailliert beschrieben. Die erzielten Ergebnisse sind im Kapitel 4 dargestellt und werden anschließend im Kapitel 5 diskutiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Arbeit wird im Kapitel 6 gegeben.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Definition des equinen Sarkoids

Der Begriff des equinen Sarkoids wurde geprägt, um diese Tumorart von anderen Tumoren in der Haut der Equiden, wie Papillomen, Fibrosarkomen, Fibromen und Granulomen zu unterscheiden (Jackson, 1936). Der Begriff basiert auf der morphologischen Beschreibung der tumorösen sarkomartigen Veränderung. Seither wurde das equine Sarkoid als semimaligner, lokal invasiver Tumor der Haut eingestuft (Jackson, 1936; Weiss, 1990). Von einer Metastasierung in innere Organe wurde nicht ausgegangen. Jüngere Publikationen sprechen jedoch, mit Bezug auf das invasive und rezidivierende Auftreten, von einer Malignität (Marti et al., 1993). Zudem existiert aufgrund der Ansiedlung an und dem späteren Einbrechen von Sarkoiden in Lymphgefäße bei der malignen Form die Möglichkeit der entfernten Metastasierung (Knottenbelt und Walker, 1995).

### 2.2 Vorkommen

Sarkoide können bei allen Equiden (Pferde, Esel, Maultiere und Zebras) auftreten (Jackson, 1936). Die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten des Vorkommens schwanken zwischen 12,9% und 67,0% aller Tumore der Equiden (Strafuss et al., 1973; Sullins et al., 1986). Sie können solitär oder multipel auftreten (Howarth, 1990). Frühe Arbeiten zu diesem Thema zeigten keine Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Rasse betroffener Pferde (Ragland et al., 1970; Howarth, 1990). Angelos und Kollegen berichteten über ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Sarkoiden bei Quarter Horses (Angelos et al., 1988). Neuere Publikationen

beschreiben eine Häufung in männlichen Individuen (Mohammed et al., 1992; Reid, 1992). Eine Akkumulation von Sarkoiden in Pferdefamilien wurde ebenfalls dargestellt (Ragland et al., 1966). Der früheste Zeitpunkt, an dem Sarkoide diagnostiziert wurden, ist bei Jährlingen (Marti et al., 1993). Meist werden Sarkoide jedoch in einem Lebensalter von 3-6 Jahren erstmals bemerkt (Strafuss et al., 1973; Marti et al., 1993).

### 2.3 Lokalisierung

Equine Sarkoide können am gesamten Körper auftreten. Am häufigsten betroffene Regionen sind der Kopf, das ventrale Abdomen, die Leistengegend und die Gliedmaßen (Jackson, 1936; Strafuss et al., 1973; Torrontegui und Reid, 1994). In einer Untersuchung von 117 Pferden wurden von insgesamt 535 Sarkoiden 32% am Abdomen, 16% im Bereich der Vorderbrust, 16% an den Hintergliedmaßen, 14 % am Kopf, 8% am Nacken, 7% am Thorax und 7% an den Vordergliedmaßen diagnostiziert (Marti et al., 1993). In einer weiteren Studie kamen bei 51 untersuchten Pferden insgesamt 219 Sarkoide vor. Davon befanden sich 50,2% in der Leistengegend, 26% am ventralen Abdomen und 14,2% am Kopf (Torrontegui und Reid, 1994).

### 2.4 Ätiologie

In zahlreichen frühen Studien wurde die Ätiologie von equinen Sarkoiden diskutiert. Die ersten Vermutungen einer infektiösen Ursache stammen bereits von Jackson im Jahr 1936 (Jackson, 1936), Olson im Jahr 1948 (Olson, 1948) und Olson und Kollegen im Jahr 1951 (Olson und Cook, 1951). Olson und Kollegen demonstrierten, dass die Inokulation von zellfreien Extrakten aus Hauttumoren von Rindern (bovine Hauttumoren) beim Pferd makroskopisch und mikroskopisch sarkoidähnliche Läsionen verursachten. Diese Läsionen zeigten jedoch im Gegensatz zu natürlich auftretenden Sarkoiden eine spontane Regression (Olson und Cook, 1951).

Auch spätere Berichte von Ragland und Kollegen über ein epizootisches Auftreten von Sarkoiden in einer Herde von verschiedenen Pferderassen (Quarter Horses, Appaloosas und Ponies) im US-Staat Washington ließen eine infektiöse Genese vermuten (Ragland et al., 1966). Voss konnte 1969 nach Übertragung von Sarkoidgewebe zwischen Pfer-

den anschließend nur bei wenigen Empfängertieren Sarkoide diagnostizieren (Voss, 1969). Dies lässt vermuten, dass neben einem infektiösen Agens auch notwendige Kofaktoren zur Etablierung von Sarkoiden beitragen. Es gilt heute als gesichert, dass Bovine Papillomviren 1 und 2 (BPV) das infektiöse Agens equiner Sarkoide sind. So gelang es Amtmann und Kollegen, DNA von bovinen Papillomviren in spontan aufgetretenen Sarkoiden nachzuweisen und zugleich zu zeigen, dass das BPV-Genom nicht in die Wirtszell-DNA integriert ist, sondern in episomaler Form vorliegt (Amtmann et al., 1980). 1985 wies Trennfeld auch in völlig intakter Pferdehaut BPV - Sequenzen nach (Trennfeld et al., 1985). Die Mitwirkung von Kofaktoren ist auch beim Menschen nicht ungewöhnlich für eine Infektion mit Papillomviren. So konnte in einer umfangreichen internationalen Studie gezeigt werden, dass bis zu 70% der untersuchten Hautproben von gesunden Menschen positiv für humane Papillomviren (HPV) waren (Antonsson et al., 2003). In einer anderen Studie wurden bei mehr als 90% der untersuchten Menschen asymptomatische HPV-Infektionen nachgewiesen (Antonsson et al., 2000). Eine BPV-Genexpression wurde von Nasir und Reid in 20 untersuchten equinen Sarkoiden mittels PCR untersucht. Sie konnten in allen analysierten Sarkoiden DNA von BPV-1 und BPV-spezifische RNA nachweisen. BPV-Typ 2 kommt nach Aussage der Autoren nur in etwa 1% der untersuchten Sarkoide vor (Nasir und Reid, 1999). Martens et al. konnten bei 19 von equinen Sarkoiden betroffenen Pferden das Vorhandensein von BPV-DNA bestätigen. Der DNA-Nachweis gelang sowohl im Tumor selbst, als auch im umliegenden gesunden Gewebe (Martens et al., 2001). Johne und Kollegen konnten das Genom von BPV 1 und BPV 2 in fast allen von Pferden stammenden Sarkoidproben feststellen (Johne et al., 2004). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Entstehung equiner Sarkoide auf eine Infektion mit BPV und dem Vorhandensein notwendiger Kofaktoren zurückzuführen ist.

### 2.4.1 Papillomviren als Ursache für equine Sarkoide

In den folgenden Abschnitten wird zunächst auf die Familie der *Papillomaviridae* und anschließend auf die Virustypen Bovine Papillomviren und Equine Papillomviren eingegangen.

### Charakterisierung von Papillomviren

Bei der Familie der *Papillomaviridae* handelt es sich um unbehüllte DNS-Viren mit einem im Durchmesser 55 nm großen ikosaedrischen Kapsid, welches das zirkuläre, bis zu 8,2 kb große doppelsträngige Genom umgibt (Kaaden und Mahnel, 1993). Weltweit kommt eine Vielzahl von Papillomviren bei Menschen und Tieren vor. Allein beim Menschen wurden 85 verschiedene Genotypen von HPV charakterisiert (Antonsen et al., 2000). Eigene Papillomviren wurden auch bei Rindern, Pferden, Schafen, Hunden, Kaninchen, Elchen und Vögeln beschrieben (Lancaster und Olson, 1982). Durch die Infektion von Epithelzellen induzieren Papillomviren in der Regel epitheliale Infektionen, die persistieren können und nur gelegentlich zur Entstehung pathologischer Formen, wie Hyperplasien, führen. Diese können dann ein progressives Wachstum zeigen und sich zu malignen Neoplasien wandeln (McBride et al., 2000; Chambers et al., 2003). Die Infektion der Epithelzellen führt zu einer Hyperplasie der Zellen in der Spindelzellschicht der Haut, der Akanthosis (Lancaster und Olson, 1982).

Bei der Entstehung von Papillomen spielen endogene Kofaktoren, wie zum Beispiel eine Immunsuppression, oder exogene Kofaktoren, wie UV-Strahlung und zusätzliche Infektionskrankheiten, eine große Rolle (Gross, 1985). Wie bereits erwähnt, sind Papillomviren spezies- und gewebespezifisch. Doch auch andere Spezies können gelegentlich infiziert werden und im Vergleich zum natürlichen Wirt, treten bei ihnen andere pathologisch-anatomische Veränderungen auf (Chambers et al., 2003). Ein Beispiel ist das Cottontailrabbit Papillomavirus (CRPV), das beim natürlichen Wirt, dem Baumwollschwanzkaninchen (Cottontail rabbit) (*Sylvilagus floridanus*) zur Ausbildung von gutartigen Hauttumoren (Papillome) führt, die meist regredieren und nur manchmal (23%) zu Karzinomen entarten. Bei einer Infektion des Hauskaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) mit CPRV kommt es nach Ausbildung von Papillomen sehr häufig (80%) zur Entartung in Form von Karzinomen mit nachfolgender Metastasenbildung (Jeckel, 2003).

### Bovine Papillomviren

Bovine Papillomviren stellen epitheliotrope Viren dar, die in der Lage sind benigne und maligne Läsionen beim Rind auszulösen (Lancaster

und Olson, 1982). Die verschiedenen klinischen Erscheinungsformen der Papillomatose der Rinder werden durch 6 unterschiedliche Papillomvirustypen (BPV 1-6) hervorgerufen. BPV 1 und 2 verursachen Fibropapillome der Haut und des Genitalepithels. Am Digestionstrakt können Fibropapillome durch BPV 3 und squamöse Papillome durch BPV 4 induziert werden. An den Zitzen führen BPV 5 zur Ausbildung von Fibropapillomen und BPV 6 zu Papillomen (Kaaden und Mahnel, 1993). Wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben, wird heute allgemein akzeptiert, dass BPV 1 und 2 mit der Genese des equinen Sarkoids assoziiert sind (Chambers et al., 2003).

Das Genom der BPV 1 lässt sich in 3 Regionen unterteilen. Die frühe Region kodiert die transformierenden Proteine E5, E6 und E7 sowie die an der Regulation der Transkription und Replikation beteiligten Proteine E1 und E2. Die späte Region kodiert die Strukturproteine L1 und L2. Zwischen beiden Regionen befindet sich die Kontrollregion, welche Promotoren und Verstärker der Transkription sowie den Ursprungsort der DNA-Replikation enthält (Chambers et al., 2003). E5 ist das haupttransformierende Protein von BPV 1. Es konnte von Carr und Kollegen in allen der 23 untersuchten equinen Sarkoiden mittels PCR nachgewiesen werden (Carr et al., 2001). E5 ist ein intrazellulär an Membranen gebundenes Protein, das über drei verschiedene Wege seine Wirkung entfaltet. Durch die stabile Bindung an die Membran des Golgiapparates oder anderer intrazellulärer Organe wird der PDGF-Rezeptor  $\beta$  (platelet-derived growth factor) aktiviert und durch Dimerisation und Transphosphorylierung modifiziert. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Produktion eines intrazellulären stimulierenden Wachstumssignals führt (DiMaio und Mattoon, 2001). Des Weiteren bindet E5 an Komponenten der Gap-Junctions, wodurch die interzelluläre Kommunikation reduziert und die infizierte Zelle letztlich von der Umgebung isoliert wird (Faccini et al., 1996). Ferner kommt es durch Alkalinisierung von Endosomen und des Golgiapparates zur intrazellulären Retention von MHC-Klasse 1-Molekülen (Marchetti et al., 2002). Folglich kann die infizierte Zelle nicht durch T-Zellen erkannt werden, da dies eine Präsentation der Zellen durch MHC-Moleküle erfordern würde (Jungi, 1996).

### **Equine Papillomviren**

O'Banion und Kollegen identifizierten 1986 das equine Papillomvirus (EPV) als Ursache von Papillomen. Die Autoren vertraten auch die The-

se, dass zwischen dem EPV und dem equinen Sarkoid eine Verbindung existiert (O´Banion et al., 1986). Dafür finden sich in der modernen Literatur aber keine weiteren Hinweise.

#### 2.4.2 Dispositionen für equine Sarkoide

**Rassedisposition:** Wie unter 2.2 kurz erwähnt, berichteten Angelos und Kollegen über eine nahezu verdoppelte Sarkoidhäufigkeit in Quarter Horses gegenüber Vollblütern (Angelos et al., 1988). Nach Meinung vieler anderer Autoren sind jedoch alle Pferderassen gleichermaßen betroffen (Sullins et al., 1986; Ragland et al., 1970; Howarth, 1990).

**Altersdisposition:** Pferde sind vorwiegend in einem Lebensalter zwischen 3 und 6 Jahren zum ersten Mal von equinen Sarkoiden betroffen (Marti et al., 1993; Strafuss et al., 1973; Sundberg et al., 1977). Seltener treten sie bereits bei Jährlingen auf (Marti et al., 1993). Eine echte Altersdisposition liegt somit nicht vor.

**Geschlechtsdisposition:** Oft wird eine Häufung in männlichen Individuen genannt, die jedoch bisher nicht signifikant belegt werden konnte (Vanselow et al., 1988; Mohammed et al., 1992; Reid, 1992). Reid und Kollegen stellten zudem in ihrer Studie mit 503 Pferden fest, dass doppelt so viele Wallache wie Hengste betroffen waren. Sie vermuten, dass das chirurgische Trauma einer Kastration in Zusammenhang mit dem Auftreten equiner Sarkoide steht. Es wird angenommen, dass durch Insekten übertragene Pathogene in die Kastrationswunde eindringen können (Reid et al., 1994; Reid und Mohammed, 1997). Dem steht entgegen, dass an dieser Lokalisation keine Häufung von Sarkoiden berichtet wurde.

**Familiäre Disposition:** Eine familiäre Häufung wurde von Ragland und Kollegen genannt (Ragland et al., 1966). Sie berichteten über das Auftreten equiner Sarkoide in einer Ponyherde. Vier der betroffenen Pferde waren gleicher Abstammung. Von anderen Autoren wurde diese Vermutung bisher nicht bestätigt, an dieser Stelle kann aber auch eine genetische Disposition in Betracht kommen.

**Genetische Disposition:** Der grundlegende Mechanismus einer genetischen Disposition ist variabel. Im Falle des equinen Sarkoids scheinen bestimmte MHC-Klasse-II-Allele mit einem besonders emp-

fänglichen Immunsystem in Verbindung zu stehen (Marti et al., 1993; Chambers et al., 2003). Allerdings fehlen an dieser Stelle weitergehende Studien mit einem großen Patientenkollektiv und entsprechenden Kontrollgruppen aus verschiedenen Pferderassen.

## 2.5 Übertragung

Obwohl bovine Papillomviren eine infektiöse Ursache für equine Sarkoide darstellen, ist der Weg der Übertragung bis heute unklar. Es wird vermutet, dass Sarkoide besonders an Wunden von Pferden auftreten, die mit Insekten als Vektoren in Kontakt gekommen sind (Voss, 1969; Chambers et al., 2003).

## 2.6 Klassifikation und klinisches Bild equiner Sarkoide

Bereits 1970 unterschieden Ragland und Kollegen drei Erscheinungsformen - einen verrukösen (Typ I), einen fibroblastischen (Typ II) und einen Mischtyp (Typ III). Alle Typen können sowohl der Hautoberfläche breit aufsitzend (sessile Form), als auch gestielt vorkommen (Ragland et al., 1970).

1981 beschrieben Pascoe und Summers einen vierten Typ, der sich durch ein sehr langsames Wachstum, haarlose Stellen mit einem oder mehreren kleinen Hautknötchen und einer Größe von 5-15 mm auszeichnet (Pascoe und Summers, 1981). 1985 bezogen Tarwid und Kollegen diese Form in die Klassifikation von Ragland aus dem Jahr 1970 ein und nannten es den okkulten Typ (Tarwid et al., 1985).

2003 unterschied Knottenbelt in seiner Studie sechs verschiedene Sarkoidtypen und deren Untertypen (Knottenbelt, 2003):

1. Okkultes Sarkoid
2. Verruköses Sarkoid
3. Noduläres Sarkoid
  - Typ A: ohne Einbezug der Haut

- Typ B: mit Einbezug der Haut
4. Fibroblastisches Sarkoid
    - Typ 1: gestielt
    - Typ 2: sessil (auf einer Basis sitzend)
  5. Gemischtes Sarkoid
  6. Malignes / Malevolentes Sarkoid

### 2.6.1 Pathologisch-anatomische Diagnose

#### **Okkultes Sarkoid**

Okkulte Sarkoide sind bekannt als langsam wachsende Tumore mit rauher, haarloser und zum Teil schuppiger Oberfläche. Sie erreichen Durchmesser von 2-5 cm und kommen besonders im Gesicht und an wenig behaarten Körperstellen vor (Knottenbelt, 2003).

#### **Verruköses Sarkoid**

Ein verruköses Sarkoid zeichnet sich primär durch seine warzenartige, häufig ulzerierte und verkrustete Oberfläche aus. Die umgebende Haut des meist sessilen Tumors kann haarlos sein. Der Tumor wächst nicht über eine Größe von 6 cm hinaus und kommt insbesondere an Körperstellen vor, die starker mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind (Lepage et al., 1998). Diese Form des Sarkoids kann jahrelang unverändert bleiben und sich bei erneuter starker mechanischer Beanspruchung in den fibroblastischen Typ umwandeln (McMullan, 1982; Brown, 1983). Verruköse Sarkoide befinden sich besonders am Kopf und in der Leisten-  
gend (Knottenbelt, 2003).

#### **Noduläres Sarkoid**

Noduläre Sarkoide sind gut definierte subkutane Knötchen, die überwiegend zwischen 5-20 mm groß sind, jedoch in seltenen Fällen auch größere Ausmaße annehmen können. Sie treten solitär oder multipel vor allem an den Augenlidern, am Penis und in der Leisten-  
gend auf. Die darüber liegende intakte Haut kann dünner werden und ulzerieren (Typ B). Im Folgenden kann sich der Tumor zu dem fibroblastischen Typ entwickeln.

### **Fibroblastisches Sarkoid**

Fibroblastische Sarkoide verfügen über eine variable Morphologie. Es kann die sessile Ausprägung mit subkutan liegenden, frei beweglichen, gelblich-weißen Knoten (Typ 2) von der gestielten Form (Typ 1) unterschieden werden. Bei der letzteren ist die Oberfläche oft ulzeriert und bakteriell infiziert. Fibroblastische Sarkoide zeigen ein rasches Wachstum und können Durchmesser von mehr als 20 cm erreichen (Lepage et al., 1998; Knottenbelt, 2003). Fibroblastische Sarkoide treten häufig am Augenlid, an den Gliedmaßen und in der Leistengegend auf (Knottenbelt, 2003).

### **Gemischtes Sarkoid (Mischtyp)**

Der Mischtyp stellt eine Übergangsform vom verrukösen und fibroblastischen Sarkoid dar. Variationen in den dominierenden Proportionen sowie in den Lokalisationen der zwei genannten Typen sind möglich (Lepage et al., 1998; Knottenbelt, 2003).

### **Malevolentes Sarkoid / Malignes Sarkoid**

Malevolente Sarkoide sind dadurch ausgezeichnet, dass sie in unmittelbarer Nähe zu Lymphgefäßen und Lymphknoten auftreten. Es handelt sich um zum Teil ulzerative Knötchen mit variablem Erscheinungsbild. Wegen ihrer Lokalisierung wird von einer starken Aggressivität und möglichen Metastasierung in innere Organe ausgegangen (Knottenbelt, 2003).

## **2.6.2 Histopathologische Diagnose**

Aufgrund des variablen Erscheinungsbildes equiner Sarkoide, der Morphologie der Hautveränderung, der anatomischen Lokalisation, des Alter des Tieres und der erhobenen Anamnese kann eine klinische Verdachtsdiagnose gestellt werden. Durch eine histopathologische Untersuchung kann die Abgrenzung zu den Differentialdiagnosen (siehe Abschnitt 2.7) erbracht werden. Allerdings wurden mögliche Komplikationen infolge einer Biopsie genannt. So berichtete Brown von der möglichen Auslösung von Sarkoiden an bisher nicht betroffenen Körperstellen (Brown, 1983) und Knottenbelt von einem sehr starkem Tumorwachstum an der Entnahmestelle (Knottenbelt, 2003). Ungeachtet ihrer anatomischen Vielfalt unterscheiden sich die Sarkoide histologisch nur wenig (Ragland et al.,

1970). Martens und Kollegen (Martens et al., 2000a) untersuchten in ihrer Studie 50 Sarkoide von 31 Pferden in Hinblick auf histologische Gemeinsamkeiten unter Berücksichtigung der Einteilung in fünf Gruppen: okkult, verrukös, fibroblastisch, nodulär und gemischt. In jedem der untersuchten Sarkoide konnten BPV-DNA und eine erhöhte Dichte an dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Das Auftreten der genannten typischen Veränderungen wurde bestätigt, eine histopathologische Unterscheidung der fünf genannten Sarkoidtypen konnte daraufhin jedoch noch nicht erbracht werden (Martens et al., 2000a).

Schon 1936 beschrieben Jackson und Kollegen das equine Sarkoid als einen biphasischen Tumor, der aus einer epidermalen und einer dermalen Komponente besteht (Jackson, 1936). Die meisten Sarkoide entsprechen dieser Einteilung. Nur selten ist die epidermale Komponente nur geringfügig oder gar nicht vorhanden (Ragland et al., 1970). Der Übergang zum gesunden Gewebe ist selten eindeutig zu erkennen (Pascoe und Summers, 1981). Die Epidermis kann hyperkeratotisch, hyperplastisch, normal oder atrophisch sein. Erosionen und Ulzerationen lassen sich oft nachweisen. Dem dermalen Anteil kommt jedoch die größere diagnostische Bedeutung zu. Es kommt zur massiven Zubildung von dermalen Fibroblasten mit erhöhter Mitoserate, die Zellkerne mit variabler Größe enthalten (Yager und Scott, 1994). Die Fibroblasten und viele unreife Kollagenfasern liegen in Bündeln, wirbel- oder fischgrätenähnlich ("heringbone pattern") angeordnet. Sarkoide sind durch tief dermal ziehende Reteleisten gekennzeichnet, wodurch eine Abgrenzung zu Fibrosarkomen möglich ist. Subepidermal ordnen sie sich oft fingerartig in einem 90° Winkel an, was als "picket fences" bzw. pallisadenartig bezeichnet wird (Ragland et al., 1970; Sullins et al., 1986; Tarwid et al., 1985). Tarwid und Kollegen vermuten, dass der Anteil der Kollagenfasern vom Alter des Sarkoides abhängt (Tarwid et al., 1985). Nach Auffassung von Pascoe und Summers sind die Kollagenfasern in Relation zur Wachstumsgeschwindigkeit des Sarkoides zu sehen (Pascoe und Summers, 1981). Ihrer Meinung nach, ist in rapide wachsenden Sarkoiden der dermale Anteil durch junge, sich infiltrativ ausbreitende Fibroblasten mit zahlreichen Mitosen gekennzeichnet. Dagegen weisen langsam wachsende Sarkoide reife Fibrozyten mit einer geringen Mitoserate aber starker Kollagenfaserproduktion auf, die eine scharfe Abgrenzung zur umgebenden Dermis schaffen (Pascoe und Summers, 1981).

## 2.7 Differentialdiagnosen

Klinisch kann nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Eine Reihe von nachfolgend aufgeführten Differentialdiagnosen (Tumore und tumorähnliche Neubildungen) ist klinisch bzw. histopathologisch auszuschließen.

### 2.7.1 Tumore

#### Papillom

Papillome sind nach Auffassung von Pascoe und Kollegen nach dem equinen Sarkoid die zweithäufigste Tumorart beim Pferd (Pascoe und Summers, 1981). Sundberg und Kollegen beschrieben es nach dem equinen Sarkoid und dem Plattenepithelkarzinom als dritthäufigste Neoplasie bei Pferden (Sundberg et al., 1977). Papillome werden zu den benignen epithelialen Geschwülsten gezählt (Weiss, 1990; Cowell und Tyler, 2002). Der Papillombildung liegt primär eine Proliferation des Epithels zugrunde, die zusätzlich durch eine massive Bindegewebsbildung in der tiefer gelegenen Lamina propria begleitet sein kann. Histologisch können in Papillomen ein zellreicher Bindegewebsgrundstock, bestehend aus fibroblastoiden Zellen, kollagenen Fasern und Blutgefäßen, und ein oberflächliches Plattenepithel nachgewiesen werden. Letzteres kann zusätzlich verändert sein. So können sowohl eine verstärkte (Hyperkeratose) als auch eine unvollständige (Parakeratose) Verhornung des Epithels vorhanden sein (Sandersleben et al., 1989). Sloet und Kollegen unterschieden die folgenden vier Formen von equinen Papillomen (Sloet und Knottenbelt, 2001):

**Congenitales Papillom:** Durch intrauterine Übertragung der Papillomviren kann eine Papillomatose bei Neonaten auftreten. Die in seltenen Fällen persistierenden Veränderungen können chirurgisch entfernt werden.

**Juveniles Papillom (Graswarzen):** Juvenile Warzen sind die häufigste Form von Papillomen. Sie treten besonders im Sommer im Bereich vom Gesicht, an den Genitalien und an den distalen Gliedmaßen auf. Oft kommt es zur Ausbildung von multiplen Warzen, die nach etwa 12 Wochen spontan regredieren.

**Papillom bei adulten Pferden:** Einzelne große oder multiple kleine Papillome können im Genitalbereich von erwachsenen Pferden vorkommen. Nur sehr selten entarten sie in einem langen Zeitraum des Bestehens oder durch vorliegende Immunsuppression zu einem malignen Tumor.

**Aurale Plaques (Akanthosis der Ohrmuschel)** Es handelt sich um graue proliferative Zubildungen an der Innenseite der Ohrmuscheln älterer Pferde, die nach dem Auftreten schmerz- und reaktionslos sind und keine Tendenz zur Regression zeigen.

### **Melanom**

Melanome sind als primär benigne Tumoren beschrieben, die Tendenz zur Malignität zeigen können (Cowell und Tyler, 2002). Es handelt sich um solitäre oder multiple Knoten, die insbesondere perianal, an der Schweifrübe oder seltener am Kopf adulter Pferde auftreten. Maligne Melanome metastasieren über die Lymphbahn oder über das Blut in regionale Lymphknoten (Cowell und Tyler, 2002). Bis zu 80% der Schimmel ab einem Lebensalter von circa 15 Jahren weisen Melanome auf (Scott, 1988). Benigne Melanome wachsen dermal oder epidermal-dermal und bestehen aus spindeligen bis epitheloiden Zellen, die variablen Melaningehalt aufweisen. Es können Zellnester auftreten, die durch feine Bindegewebssepten zur Umgebung abgegrenzt werden (Scott, 1988; Smith et al., 2002). Die häufig anaplastischen Zellen maligner Melanome zeigen ein verstärkt wirbeliges und nestartiges Wachstum sowie oft einen Verlust der Melaninbildung (Scott, 1988; Smith et al., 2002).

### **Fibrom**

Fibrome gehören zu den benignen, mesenchymalen Tumoren. Diese langsam wachsenden Tumore betreffen überwiegend adulte Tiere und weisen keine Tendenz zur Metastasierung und Rezidivierung auf (Dahme et al., 2007). Sie manifestieren sich zum einen im Fibroma durum, einer harten Geschwulst, in der eine Vielzahl an dicht liegenden Kollagenfaserbündeln mit wenig Zellkernen dominiert. Zum anderen kommt das weiche Fibroma molle vor, dass durch wenige kollagene Fasern mit vielen Zellkernen charakterisiert ist (Weiss, 1990). Die Zellen eines Fibroms zeigen uniforme Größe und Gestalt sowie runde Zellkerne (Cowell und

Tyler, 2002). Sie können durch ihr expansives Wachstum zur Kompression des umliegenden Gewebes führen, wachsen jedoch, im Gegensatz zu den Sarkoiden, nicht infiltrativ (Tarwid et al., 1985; Dahme et al., 2007). Fibrome kommen besonders am Ohr, am Augenlid, am Oberkiefer und an den Gliedmaßen vor (Sundberg et al., 1977). Fibrome können auch im Strahlbereich des Hufs als derbe Geschwulst vorkommen (Knottenbelt und Pascoe, 2000).

### **Neurofibrom (Schwannom)**

Neurofibrome gelten als von den Schwannschen Zellen ausgehende benigne Tumore (Weiss, 1990). Pascoe und Summers beschrieben sie als 2-3 mm große, schrotkugelähnliche Gebilde im Bereich der Unterhaut von Augenlidern, die solitär oder multipel vorkommen können (Pascoe und Summers, 1981). Makroskopisch können diese Tumore mit dem okkulten Sarkoid verwechselt werden, jedoch fehlen im Vergleich hierzu die haarlosen Bereiche. Histologisch können spindelförmige neoplastische Schwannsche Zellen mit länglich plumpen Zellkernen nachgewiesen werden. In ähnlicher Anordnung wie beim equinen Sarkoid ist ein variabler Kollagenfasergehalt zu erkennen (Stannard und Pulley, 1990; Stark et al., 2002). Entsprechend besteht die Differenzierung zum Sarkoid in dem histologischen Nachweis von Nervengewebe (Tarwid et al., 1985), gegebenenfalls mit Hilfe der Immunhistochemie.

### **Plattenepithelkarzinom**

Plattenepithelkarzinome sind maligne epitheliale Tumore (Weiss, 1990). Sie treten bei Pferden ab dem 4. Lebensjahr bevorzugt an wenig behaarten Körperstellen oder mukokutanen Übergängen auf (Pascoe und Summers, 1981). Sundberg und Kollegen beschrieben das Vorkommen besonders bei älteren Tieren (Sundberg et al., 1977). Histopathologisch können abgrenzend zum Sarkoid folgende Merkmale diagnostiziert werden. Der Differenzierungsgrad eines Plattenepithelkarzinomes kann erheblich variieren (Sandersleben et al., 1989). Relativ ausgereifte Plattenepithelkarzinome bestehen aus Epithelzapfen, die den Aufbau der Epidermis imitieren. Angrenzend an das Stroma finden sich basalzellähnliche Geschwulstzellen, die in Richtung Stachelzellen differenzieren und verhornte Zellen umgeben. Da das Horn nicht an der Oberfläche abgegeben werden kann, sammelt es sich in Form von Hornperlen zwischen

den Zellsträngen. Die infiltrierend wachsenden Zellstränge können von chronisch entzündlichen Prozessen begleitet sein, was zu einer, zum Teil erheblichen, Fibroblastenproliferation führt. Bei unreifen Tumorformen erscheint das histologische Bild weitaus unregelmäßiger, denn nur ein Teil der basalzellähnlichen Geschwulstzellen reift zu Stachelzellen und es kommt nur bei wenigen Zellen zur Verhornung (Sandersleben et al., 1989; Stannard und Pulley, 1990).

### **Fibrosarkom**

Fibrosarkome sind beim Pferd selten vorkommende, maligne mesenchymale Tumore, die Tendenz zur Metastasierung in innere Organe und starke Rezidivneigung zeigen (Tarwid et al., 1985; Weiss, 1990; Dahme et al., 2007). Sie können sowohl von kutanen als auch von subkutanen Geweben ausgehen und zeigen oft eine oberflächliche Ulzeration (Cowell und Tyler, 2002). Lepage und Kollegen berichteten von Fibrosarkomen im Inguinalbereich, die nur histologisch vom equinen Sarkoid zu unterscheiden sind (Lepage et al., 1998). Die meist anaplastischen Zellen von Fibrosarkomen erscheinen oval geformt und weisen oft nur einen undeutlichen eosinophilen Cytoplasmaanteil auf (Cowell und Tyler, 2002; Dahme et al., 2007). Die Tumorzellen liegen dicht aneinander in Zellbündeln, die zum Teil im Fischgrätenmuster angeordnet sind (Dahme et al., 2007). Gelegentlich sind mehrkernige Zellen zu finden. Variationen in Zellgröße, Zellkerngröße und Zellform sprechen für das maligne Potential des Tumors (Cowell und Tyler, 2002).

### **Mastzelltumor**

Mastzelltumore der Haut der Equiden sind seltene, benigne mesenchymale Tumore. Oft handelt es sich um solitäre Läsionen an Kopf, Hals und an den Gliedmaßen (Cowell und Tyler, 2002). Nicht häufig kommt es zur Ausbildung multipler Tumore bei Fohlen (Scott, 1988). Sie zeigen zum Teil sehr starkes Wachstum jedoch keine Tendenz zur Metastasierung und Rekurrenz (McEntee, 1991). Da die Tumorzellen diffus in das Bindegewebe der Haut und der Unterhaut infiltrieren, ist eine Abgrenzung zum umgebenden Gewebe oft schwierig. Histologisch kann auch in einem Tumor ein stark variierender Differenzierungsgrad der Tumorzellen festgestellt werden. Weit ausgereifte Tumorzellen enthalten in ihrem Zytoplasma einen hohen Gehalt an Heparin- und Histamin enthaltender Granula (Sandersleben et al., 1989; Cowell und Tyler, 2002;

Dahme et al., 2007). Es kommen jedoch auch Tumorformen vor, in denen nur vereinzelte Zellen wenig Granula enthalten. Hier können zwischen den Mastzellen liegende eosinophile Granulozyten diagnostiziert werden (Sandersleben et al., 1989). Dem entsprechend besteht die Differenzierung zum Sarkoid in dem histologischen Nachweis der enthaltenen Granula.

### **Kutanes Lymphom**

Kutane Lymphome, auch epitheliotrope Lymphome genannt, sind seltene Tumore, die bevorzugt in Epidermis und Dermis bei älteren Pferden vorkommen (Cowell und Tyler, 2002). Sie können sowohl solitär als auch multipel über den ganzen Körper verteilt auftreten (Taylor und Hillyer, 2001). Die Oberfläche der Tumore kann erodiert oder ulzeriert sein (Dahme et al., 2007). Eine histologische Untersuchung kann diese Neubildungen gegenüber Sarkoiden abgrenzen. So ist das histologische Bild von einer Vielzahl an unterschiedlich ausdifferenzierten, zum Teil atypischen, Lymphozyten mit starkem Epitheliotropismus geprägt. In höheren Epidermislagen finden sich oft kleine herdförmige Tumorzellinseln (Pautrier Mikroabszesse) (Cowell und Tyler, 2002; Dahme et al., 2007).

## **2.7.2 Tumorähnliche Neubildungen**

### **Granulationsgewebe**

Granulationsgewebe entsteht im Rahmen chronischer, proliferativer Entzündungen des Bindegewebes durch Bildung eines bindegewebigen Ersatzgewebes mit Neubildung und Einsprossung von Blutgefäßen. Charakteristisch für junges Granulationsgewebe ist das Dominieren von Fibroblasten und Endothelzellen. Weiterhin typisch sind im rechten Winkel zu Fibroblasten und Fibrozyten angeordnete Kapillarsprosse (Dahme et al., 2007). Älteres Granulationsgewebe weist vermehrt kollagene Fasern und einen verminderten Zellgehalt auf (Dahme et al., 2007). Die makroskopische Differenzierung zum Sarkoid, insbesondere dem fibroblastischen Typ des Sarkoids, ist schwierig (Tarwid et al., 1985; Pascoe und Summers, 1981). Tarwid und Kollegen beschrieben zudem das Vorkommen von Granulationsgewebe auf der Oberfläche von Sarkoiden (Tarwid et al., 1985). Im Vergleich zu equinen Sarkoiden können in der Histologie die gerichtete Anordnung der Kollagenfasern und die rechtwinklig

dazu verlaufende Blutgefäße nachgewiesen werden (Ragland et al., 1970; Tarwid et al., 1985).

### **Kutane Habronematose**

Die kutane Habronematose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Helminthen-Larven der Gattungen *Habronema* und *Draschia* verursacht werden können (Sloet und Knottenbelt, 2001). Als Vektoren dieser weltweit verbreiteten Erkrankung werden Fliegen angesehen. Es können infektiöse Larven über abgeschluckte oder auf Wunden sitzenden Fliegen übertragen werden. Im Fall des zuletzt genannten Infektionsweges dringen die Larven in das Gewebe ein und führen dort zur massiven Bildung von Granulationsgewebe (Eckert, 1992), der kutanen Habronematose. Betroffene Lokalisationen sind vor allem die Umgebung der Augen, die Beine, die Präputialregion und Wunden. Eine saisonale Häufung, übereinstimmend mit der Aktivität von Insekten, wird beschrieben (Ragland et al., 1970; Stannard und Pulley, 1990; Tarwid et al., 1985). Die meisten Läsionen dieser "schlechtheilenden Sommerwunden" verschließen sich am Ende des Sommers spontan (Sloet und Knottenbelt, 2001). Histologisch sind neben einer granulomatösen, purulenten Dermatitis eine massive Ansammlung von eosinophilen Granulozyten und Larven festzustellen (Lepage et al., 1998).

### **Botryomykose**

Die Botryomykose ist eine seltene Erkrankung, die sich in solitären oder multiplen, 1-2 cm großen Hautknötchen äußert, die fisteln können. Es handelt sich hierbei um noduläre Granulome, die Bakterien, insbesondere Staphylokokken enthalten. Die Erreger dringen über perforierende Traumen in die Haut ein und führen dort zur Ausbildung von schlecht heilenden Abszessen (Sloet und Knottenbelt, 2001).

### **Myzetom**

Bei dem Myzetom handelt es sich um lokale, meist solitäre, selten auftretende, pyogranulomatöse Läsionen der Haut und des Unterhautgewebes, die teilweise Tendenz zur Fistelbildung zeigen. Nach erfolgter Inokulation über Hautverletzungen bilden die Erreger in Dermis und Subcutis Kolonien aus, die selbst makroskopisch als Körnchen sichtbar sind.

Als typische Erreger kommen mehrere Pilzarten in Betracht, die natürlicher Weise im Erdboden und auf Pflanzen vorkommen. Beim Pferd wurden vor allem Schimmelpilze, (beispielsweise *Pseudoallescheria boydii*), nachgewiesen. Im fortschreitenden Prozess kann es ausgehend von den Pilzkolonien zur Zerstörung des umgebenden Gewebes, wie Muskulatur und Knochen, kommen. Histopathologisch kann in den Knötchen ein granulomatöses Erscheinungsbild nachgewiesen werden. Die Pilzsporen und Pilzkolonien sind dicht von einer großen Anzahl neutrophiler Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen umgeben. Bindegewebe befindet sich sowohl trabekelähnlich durch den Knoten ziehend, als auch als äußere Abgrenzung um die Knoten (McEntee, 1987). Da auch bei Sarkoiden eine Infektion mit diesen saprophytären Erregern auftreten kann, ist der histologische Nachweis der Pilzkulturen ein zusätzliches Differenzierungspotential.

### **Alopecia areata**

Die Alopecia areata ist eine idiopathische (ohne erkennbare Ursache), nicht entzündliche Hautveränderung, die durch mehr oder weniger runde haarlose Regionen gekennzeichnet ist, wodurch es differentialdiagnostisch besonders zum okkulten Sarkoidtyp in Betracht kommt (Sloet und Knottenbelt, 2001).

## **2.8 Prognose**

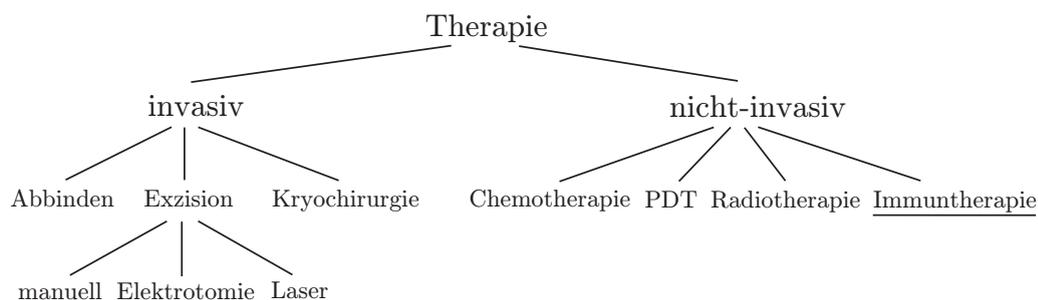
Die Prognose von equinen Sarkoiden ist immer im Zusammenhang mit dem Sarkoidtyp sowie der Größe und der Lokalisation der Tumore zu stellen (Sloet und Knottenbelt, 2001; Carstanjen und Lepage, 1998). Es wurde zudem beschrieben, dass die Aggressivität des Vorliegens equiner Sarkoide häufig unterschätzt wird und eher eine vorsichtige Prognose gestellt werden sollte (Carstanjen und Lepage, 1998). Weiterhin empfehlen Carstanjen und Lepage inaktive, anatomisch und optisch wenig störende Sarkoide nicht zu therapieren, da beispielsweise die Gefahr einer Hyperproliferation und Rezidivierung nach misslungener chirurgischer Therapie gegeben ist (Carstanjen und Lepage, 1998). Die Therapie solitärer Sarkoide wird im Allgemeinen günstiger eingestuft als bei multiplem Auftreten der Tumore (Lane, 1977). Die Prognosen der verschiedenen Therapiemethoden, die von vielen Autoren unterschiedlich eingeschätzt wurden, sind im folgenden Abschnitt 2.9 beschrieben.

## 2.9 Therapie

Es existiert eine Vielzahl an Behandlungsmethoden. In Anlehnung an Carstanjen und Kollegen (Carstanjen und Lepage, 1998) besteht eine Abhängigkeit der Auswahl der Therapie von folgenden Faktoren:

- Zahl der Tumore,
- Typ der Tumore,
- Volumen und Oberflächengröße der Tumore,
- Anatomische Lokalisation der Tumore,
- Aggressivität der Tumore,
- Erfahrung und technische Ausstattung des behandelnden Tierarztes.

Die publizierten Ergebnisse über die Therapie equiner Sarkoide stammen meist aus Universitäten und spezialisierten Pferdekliniken. Die Bedeutung für die Behandlung primärer, nicht vorbehandelter Sarkoide ist in diesem Sinne fraglich (Marti et al., 1993). Im Folgenden werden die wesentlichen, in der Literatur genannten Therapieverfahren des equinen Sarkoids dargestellt (siehe Abbildung 3.1). Prinzipiell kann zwischen invasiven und nicht-invasiven Verfahren unterschieden werden, die allein oder in Kombination angewendet werden (Carstanjen und Lepage, 1998). Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Immuntherapie wird gesondert im Abschnitt 2.10 erläutert.



**Abbildung 2.1:** Überblick über die häufig angewendeten Therapieformen zur Behandlung equiner Sarkoide

### 2.9.1 Invasive Therapieformen

#### Abbinden

Das einfachste invasive Verfahren zur Therapie von Sarkoiden ist das Abbinden. Diese Methode ist generell nur bei gestielten Sarkoiden an-

wendbar und sollte auch dort nur in Kombination mit anderen Therapieverfahren durchgeführt werden. Beim Abbinden mittels Fäden oder Gummis wird zunächst die Durchblutung des Tumors unterbrochen. In der Regel kommt es nachfolgend zur Nekrosebildung und letztlich zur Abstoßung des Sarkoids. Zu beachtende Risiken sind die erhebliche Blutungsneigung, eine relativ hohe Infektionsgefahr und der Verbleib von Tumorrestgewebe an der Abrißstelle, welches wiederum Ausgangspunkt für neues Tumorwachstum darstellen kann (Carstamjan und Lepage, 1998).

### **Kryochirurgie**

In der Tumorchirurgie werden auch häufig kryochirurgische Verfahren angewendet. Bei diesen kommt es - wie beim Abbinden - nicht zur sofortigen Entfernung des Tumorgewebes. Die Applikation extrem tiefer Temperaturen führt lediglich zur gezielten Zerstörung von Tumorzellen (Seim, 1980; Robinson, 1997). Dieser Vorgang ist abhängig vom Wassergehalt des behandelten Gewebes, der verwendeten kryogenen Substanz, der erreichten Temperatur, der Auftaugeschwindigkeit und der Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen (Diehl et al., 1988). Bei der Durchführung ist es entscheidend, eine irreversible Zellschädigung durch die Bildung intrazellulärer Eiskristalle mittels schneller Abkühlung um mindestens 100 K pro Minute und eine langsame Auftauphase zu erreichen (Diehl et al., 1988). Gleichzeitig kommt es dabei zur zellschädigenden Denaturierung von Proteinen und Lipoproteinkomplexen der Zellmembran. In den ersten Tagen nach der Kryochirurgie treten Schwellungen, Hyperämien, Ödeme und Nekrosen auf (Marti et al., 1993). Als Kühlmittel wird vor allem flüssiger Stickstoff eingesetzt. Die dabei erreichte Minimaltemperatur der Tumorzellen liegt zwischen  $-20^{\circ}\text{C}$  bis etwa  $-30^{\circ}\text{C}$  (Lane, 1977; Bertone und McClure, 1990). Eine Überwachung der Temperatur mittels in den Tumor implantierter Thermosonden ist mitunter sinnvoll (Joyce, 1976). Bei falscher Temperatursteuerung kommt es entweder zu einer unzureichenden Zellzerstörung oder zum Übergang der zerstörenden Effekte auf das umliegende Gewebe. Daher sollte das umgebende Gewebe unbedingt, zum Beispiel mittels Auflegen von Styropor, geschützt werden (Lane, 1977). Mindestens zwei bis drei Gefrier-Auftau-Zyklen sind für ein zufriedenstellendes Ergebnis erforderlich (Joyce, 1976). Da die kryologischen Effekte nur in unmittelbarer Umgebung des Applikationsortes ausreichend sind, ist es ratsam, große

Tumore vor der Therapie durch andere Verfahren chirurgisch zu verkleinern (Diehl et al., 1988). Die maximal mögliche Eindringtiefe beträgt ca. 6 cm (Farris et al., 1975), doch sollte bereits ab einer Tumorgöße von 2 cm bis 3 cm Durchmesser eine vorherige chirurgische Verkleinerung erfolgen (Lane, 1977; Krahwinkel et al., 1976). Denn verbleibt Sarkoidgewebe, so kann anschließend ein verstärktes Tumorwachstum auftreten (Knottenbelt, 2003). Vorteile der Kryochirurgie liegen im einfachen Gebrauch, der relativ geringen Schmerzhaftigkeit und der geringen Blutungsneigung. Nachteilig sind mangelhafte kosmetische Effekte und die limitierte Größe behandelbarer Tumore. Nach der sekundären Wundheilung kann durch die Zerstörung der Melanoblasten in der Behandlungsumgebung eine Leukotrichosis auftreten und aufgrund der Schädigung der Haarfollikel kommt es mitunter zur Alopezie (Vrins et al., 1992; Marti et al., 1993). Weitere mögliche Risiken sind neben dem Auftreten von Hyperämien und Ödemen, nervale Paralysen und Arthritiden. Eine Anwendung in der Umgebung der Augen sollte nicht erfolgen (Lane, 1977). Die Erfolgsrate der Kryochirurgie liegt nach Angaben vieler Autoren bei etwa 70% (Diehl et al., 1988; Lane, 1977; Klein, 1987; Davidson, 2000). Die Rezidivrate wird in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation und der Tumorgöße beschrieben (Carstanjen und Lepage, 1998).

### **Exzision**

Eine für nahezu alle Typen equiner Sarkoide grundsätzlich geeignete Therapiemethode ist die **manuelle chirurgische Entfernung**. Aufgrund der schlechten Abgrenzbarkeit des Tumors gegenüber gesundem Gewebe ist jedoch eine großzügige Umschneidung erforderlich. Auf diese Weise kann auch die Gefahr der Verschleppung von Sarkoidzellen verringert werden. Sie ist eine Ursache für die in der Literatur angegebenen hohen Rezidivraten bei alleiniger manueller chirurgischer Entfernung von Sarkoiden (Howarth, 1990). Eine weitere Ursache hoher Rezidivraten stellt eine mögliche latente BPV-Infektion des umgebenden Gewebes dar. Denn sollten die Schnittträger BPV-positiv sein, so ist eine lokale Rekurrenz wahrscheinlich (Martens et al., 2001). Teilweise entfernte Sarkoide können sich zudem in aggressive, schnell wachsende fibroblastische Tumoren umwandeln (Wyman et al., 1977). Auftretende Nahtdehiszenzen sind eine weitere Ursache für Rezidive. Sie sind meist Folge von zu hoher Spannung beim Wundverschluß, postoperativen Wundinfektionen und zu starker mechanischer Irritation und Motilität

der Wundnaht (Diehl et al., 1988). Mittels Hauttransplantation können Häufigkeit und Ausmaß von Nahtdehiszenzen reduziert werden. Dies basiert auf einem verkürzten Heilungsprozess und einer verringerten Granulationsgewebekonstruktion, wodurch außerdem bessere kosmetische Effekte erzielt werden (Wilson et al., 1987; Carstanjen und Lepage, 1998). Die Rezidivrate bei der manuellen chirurgischen Entfernung von equinen Sarkoiden wird in der Literatur mit durchschnittlich 50% angegeben (Ragland et al., 1970). Es wurde jedoch auch über Erfolgsraten von bis zu 64% berichtet (Diehl et al., 1988). Ragland und Kollegen beschrieben die häufigsten Rezidive innerhalb eines halben Jahres nach chirurgischer Entfernung (Ragland et al., 1970). Der Erfolg dieser Methode ist letztlich in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation sowie der chirurgischen Technik zu sehen.

Bei der auch als Hochfrequenz-Chirurgie bezeichneten **Elektrotomie** erfolgt das Schneiden des Gewebes mittels Wechselstrom. Dieser wird dazu mit sehr hoher Frequenz (300 kHz bis 2 MHz) durch das Gewebe geleitet. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der manuellen chirurgischen Entfernung mit einem Skalpell ist, dass gleichzeitig mit dem Schnitt des Gewebes eine Blutungsstillung durch Koagulation (Verschluss) der betroffenen Gefäße erfolgen kann. Zudem ist die Gefahr der Verschleppung von Tumorzellen gegenüber der manuellen chirurgischen Entfernung geringer. In der Tumorchirurgie wird häufig die bipolare Elektrotomie angewendet. Dabei wird eine möglichst große Fläche mit dem Patienten verbunden (Neutralelektrode). Am anderen Pol befindet sich das chirurgische Instrument (Aktivelektrode). Der Strom fließt über den Weg des geringsten Widerstandes zwischen der Aktivelektrode und der Neutralelektrode. In Abhängigkeit vom spezifischen Gewebewiderstand und weiteren Faktoren wird das Gewebe dabei erwärmt. Dieser thermische Effekt wird in der Hochfrequenzchirurgie genutzt, um Gewebe gezielt zu bearbeiten. Um eine Koagulation durchzuführen, wird das Gewebe langsam erhitzt, so dass intra- und extrazelluläre Flüssigkeiten verdampfen und Zellproteine thermisch koagulieren. Im Gegensatz dazu wird ein Schneiden durch sehr zügiges Erhitzen des Gewebes erreicht. Das Gewebe zerreißt aufgrund des dabei entstehenden Dampfdruckes erhitzter intra- und extrazellulärer Flüssigkeiten.

Während bei der Elektrotomie ein mechanischer Kontakt zwischen dem chirurgischen Werkzeug und dem Gewebe zumindest zeitweise hergestellt werden muss, ist dies bei der **Laserchirurgie** nicht notwendig. Daher ist die Verschleppung von Tumorzellen durch das chirurgische Werkzeug bei dieser Methode noch weiter verringert. Der eigentliche Mechanismus der Bearbeitung des Gewebes ähnelt aber dem der Elektrotomie. Denn auch bei der Bearbeitung mittels Laser kommt es zur Erwärmung des Gewebes, welche aber nicht durch einen elektrischen Strom sondern durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung, der Laserstrahlung, verursacht wird. Diese Absorption erfolgt je nach Wellenlänge und Intensität der Laserstrahlung in bestimmten Gewebebestandteilen und ermöglicht daher eine gewisse Anpassung an die jeweilige Arbeitsaufgabe. Wird das Gewebe durch die Wechselwirkung mit der Laserstrahlung auf etwa 60°C erwärmt, so kommt es zur Eiweißdenaturierung. Eine Erhitzung auf 100°C führt zur Austrocknung und folglich zur Schrumpfung des Gewebes. Bei einer schnellen Erhitzung auf über 350°C verdampft das bestrahlte Gewebeareal sofort, wodurch ein dem klassischen Schneiden recht ähnlicher Bearbeitungseffekt erzielt wird (Schnabel, 2000). Für Anwendungen im Bereich der Dermatologie kommen häufig  $CO_2$ -Laser zum Einsatz (Wellenlänge 10.600 nm). Strahlung dieser Wellenlänge wird durch Wasser an der Gewebeoberfläche absorbiert und dringt daher kaum in tiefer gelegene Bereiche des Gewebes ein. Kleinere bearbeitungsbedingte Blutungen werden durch sofortige Koagulation gestoppt (Diehl et al., 1988; Palmer und McGill, 1992). Nach erfolgter Entfernung des Sarkoides mittels Laserchirurgie liegt meist eine reaktionslose, üblicherweise trockene Wunde vor, die beim Vorhandensein von genügend Gewebe primär verschlossen werden kann oder sekundär ohne Hypergranulation ausheilt (Diehl et al., 1988). Die erzielten kosmetischen Ergebnisse sind überwiegend gut (Bertone und McClure, 1990), Narbenbildung oder eine Leukotrichosis sind selten (Carstanjen et al., 1996; McCauley et al., 2002). Nachteile der Laserchirurgie sind die vergleichsweise hohen Kosten und die Nicht-Anwendbarkeit in der unmittelbaren Umgebung der Augen des Patienten. Auch erschwert der notwendige Laserschutz mitunter die Arbeit des Operateurs. Die Erfolgsraten der Studien zur Laserchirurgie equiner Sarkoide sind in der Literatur mit 60-80% angegeben (Diehl et al., 1988; Carstanjen et al., 1996; McCauley et al., 2002).

## 2.9.2 Nicht-invasive Therapieformen

### Photodynamische Therapie

Bei der photodynamischen Therapie (PDT) handelt es sich um eine Kombination der Anwendung eines Chemotherapeutikum (Photosensitizer) und Lichtstrahlung, zum Beispiel Laserstrahlung. Hierbei kommt es durch die applizierte Bestrahlung zur lokalen Aktivierung des im Bestrahlungsgebiet vorhandenen Sensitizers, wodurch eine Apoptose der Tumorzellen ausgelöst wird. Es gibt systemisch angewendete Sensitizer, die sich aufgrund biochemischer Prozesse insbesondere in einem Tumorgebiet anreichern, aber auch eine lokale intratumorale Applikation ist möglich. So wird beispielsweise nach der intratumoralen Injektion des Chemotherapeutikums der Tumor anschließend mittels eines Argon-Ionen-Lasers bestrahlt (Ali und Olivo, 2002; Ali et al., 2002). Bei einer PDT-Studie mit dem Sensitizer Hypericin wurde eine bis zu 90%-ige Reduktion behandelter Sarkoide erzielt (Martens et al., 2000b). Die PDT ist eine verhältnismäßig aufwendige Therapieform, deren prinzipieller Vorteil systemischer Anwendbarkeit sich beim Tier aus verschiedenen Gründen nur bedingt nutzen lässt. Beispielsweise sind damit verbundene Kosten sowie der oft notwendige länger andauernde Lichtschutz beim Tier kaum vertretbar.

### Chemotherapie

Es existieren zahlreiche Substanzen, die zur chemotherapeutischen Behandlung equiner Sarkoide genutzt werden. Sie werden entweder lokal aufgetragen oder injiziert bzw. implantiert. Die Anwendung der am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika wird nachfolgend beschrieben.

Die **lokale Applikation von Chemotherapeutika** wird täglich über einen längeren Zeitraum angewendet. Der Vorteil liegt darin, dass diese Behandlung leicht durchgeführt werden kann. Entscheidende Nachteile bestehen in der langen Therapiedauer und der limitierten Eindringtiefe der Substanzen. Daher können nur kleine, oberflächlich liegende Tumoren behandelt werden. Tumore mit einem großen Durchmesser müssen vor Beginn der lokalen Therapie chirurgisch abgetragen werden (Bertone und McClure, 1990). In der Literatur beschriebene lokal applizierbare Chemotherapeutika sind 5-Fluorouracil und Tazaroten.

**5-Fluorouracil** wirkt antimetabolisch, indem es die Zellen während der Mitosephase schädigt (McConghy et al., 1994). Es handelt sich um ein fluoriertes Pyrimidin-Derivat, das zytostatische Wirkungen besitzt, da eine Beeinträchtigung der Synthese von Nukleinsäuren stattfindet. Dies wird vor allem in Zellen deutlich, die sich schnell teilen und in größerem Umfang Fluorouracil aufnehmen (Kufe et al., 2003). Nach einer chirurgischen Abtragung des Tumors wird eine bis zu drei Monaten andauernde lokale Auftragung empfohlen (Bertone und McClure, 1990; Knottenbelt und Walker, 1995). In den ersten Tagen nach der Applikation treten Schwellungen, Rötungen und Ulzerationen auf. Eine Schmerzhaftigkeit konnte zudem beobachtet werden (Bertone und McClure, 1990; Knottenbelt und Walker, 1995).

**Tazaroten** gehört zur Substanzklasse der Retinoide mit Ethinstruktur. Es liegt als inaktive Vorstufe vor und wird im Bereich der Haut durch Esterspaltung in die aktive freie Form, Tazarotensäure, umgewandelt. Seine aktive Stufe reguliert spezifisch die Genexpression und moduliert damit die Zellproliferation, Zellhyperplasie und -differenzierung (Kufe et al., 2003). Tazaroten findet bei der Therapie okkult Sarkoide Anwendung. Okkulte Sarkoide, die aufgrund ihrer Lokalisation oder Ausbreitung zunächst nicht chirurgisch entfernt werden können, sind nach lokaler Anwendung von Tazaroten chirurgisch oft entfernbare. Innerhalb einer von Knottenbelt empfohlenen Behandlung, können folgende verschiedene Phasen der Gewebereaktion beobachtet werden (Knottenbelt, 2005): In der ersten Woche wird die lokale Applikation dreimal täglich durchgeführt. Bereits nach einigen Tagen treten Schwellungen und Rötungen auf. Etwa ab Ende der zweiten Woche, in der die Applikation zweimal täglich erfolgt, erscheint die behandelte Region schmerzhaft. Am Ende der dritten Woche, in der die Substanz nur noch einmal täglich aufgetragen wird, können das Zusammenziehen des Tumors und der Verlust seiner flachen Ausprägung zu Gunsten eines erhabenen, kompakten Gebildes beobachtet werden. Nach Ende dieser durchgeführten Therapie kann das Sarkoid nun oft leichter chirurgisch entfernt werden (Knottenbelt, 2005).

Die **Injektion und Implantation von Chemotherapeutika** stellt eine weitere Möglichkeit der Chemotherapie dar. Substanzen können direkt injiziert werden oder Implantat-gebunden appliziert werden. Bei der intraläsionalen Injektion von Substanzen besteht die Möglichkeit Substanzen zu verwenden, die bei systemischer Wirkung toxisch sein können (Theon et al., 1993). Als Nachteil ist die mögliche Keimverschleppung von der Oberfläche des Tumors in die Tiefe mit folgender Infektion zu nennen (Theon et al., 1993). Neben dem Wirkstoff können Implantate zusätzlich Epinephrin enthalten, wodurch der schnellen Resorption des Wirkstoffs entgegengewirkt wird. Ein weiterer Nachteil einer Implantation ist der notwendige Implantatwechsel um erforderliche Wirkspiegel aufrechtzuerhalten (Turrel et al., 1985). In der Literatur beschriebene Chemotherapeutika zur Injektion bzw. Implantation sind Cisplatin und Xanthat.

**Cisplatin** gehört zur Gruppe der anorganischen Schwermetallkomplexe und verfügt über eine zytostatische Wirkung. Diese beruht auf der Bindung an Nukleinsäuren und der Ausbildung von Quervernetzungen ("cross links") (Kufe et al., 2003), wodurch die DNA-Synthese inhibiert wird (Raymond et al., 1998). Bei systemischer Anwendung ist Cisplatin jedoch nephrotoxisch, neurotoxisch und kann zu gastrointestinalen Störungen führen.

Das Vorliegen als eine sehr stabile Wasser-in-Öl-Emulsion verhindert eine Resorption und somit eine systemische Wirkung. Theon und Kollegen nannten eine Konzentration 3,3 mg Cisplatin/ml Emulsion, bestehend aus Wasser und Sesamöl, als zufriedenstellende Formulierung. Die Dosis für kleinere Tumoren ist etwas höher und für größere Tumoren etwas geringer zu wählen. Die Autoren beschrieben folgendes Therapieschema: Es erfolgen in Abständen von jeweils zwei Wochen vier intratumorale Injektionen von etwa  $0,97 \text{ mg/cm}^3$  Tumor. Lokale Reaktionen im Rahmen der Therapie sind als Schwellung, Rötung und Ödem in verschiedenen Ausprägungen sichtbar (Theon et al., 1993). Knottenbelt beschrieb teilweise gute Erfolge in der Therapie kleiner, nodulärer und fibroblastischer Sarkoide (Knottenbelt, 2003). Cisplatin kann allein oder in Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen, wie 5-Fluorouracil verwendet werden (Bertone und McClure, 1990). In einer Studie konnte unter Verwendung von Implantaten, die Cisplatin und 5-

Fluorouracil kontinuierlich abgeben, in 80% eine Regression der behandelten Sarkoide um die Hälfte festgestellt werden (Bertone und McClure, 1990).

Eine Kombination mit Interleukin 2 (IL-2) kann nach Spoormakers et al. in der Therapie von equinen Sarkoiden gute Erfolge bringen. In ihrer Studie mit 35 Pferden wurden den Tieren täglich intratumoral 200.000 IE IL-2 an 5 Tagen (Gruppe 1) oder 10 Tagen (Gruppe 2) injiziert. Einer dritten Gruppe wurden initial 1,0 mg/cm<sup>2</sup> Cisplatin und am 10. Tag 9 Millionen IE IL-2 intratumoral injiziert. Nach 12 Monaten konnte bei 18% der Pferde der ersten Gruppe und bei 10% der Tiere der zweiten Gruppe eine komplette Regression diagnostiziert werden. Dagegen zeigten 53% der Patienten der dritten Gruppe eine komplette Rückbildung der Sarkoide (Spoormakers et al., 2003).

**Xanthat** verfügt über antivirale und antitumorale Eigenschaften (Amtmann und Sauer, 1987). So wurde eine Hemmung der Replikation und Transkription von RNA- und DNA-Viren beschrieben (Amtmann et al., 1985). Carstanjen und Lepage nannten zudem eine Aktivierung der T-Lymphozyten und der Makrophagen als immunologische Wirkung (Carstanjen und Lepage, 1998). In einer experimentellen Studie über die Therapie von equinen Sarkoiden mittels Xanthatderivaten konnte eine komplette Tumorrogression bei fünf von sechs Sarkoiden erreicht werden. (Otten et al., 1994). Bei wiederholter Anwendung können allerdings ernste Nebenwirkungen, wie Fieber, Lahmheiten und Ödeme auftreten (Otten et al., 1994).

### Radiotherapie

Unter Radiotherapie ist die Nutzung radioaktiver Strahlen zu verstehen. Die radioaktiven Substanzen werden in Form von Kugeln, Nadeln oder Drähten in Tumore implantiert und nach Freisetzung einer bestimmten Strahlungs-dosis wieder entfernt (Turrel et al., 1985). Verwendete Radioisotope sind vor allem Iridium ( $Ir^{192}$ ), Radium ( $Ra^{226}$ ), Gold ( $Au^{198}$ ), Radon ( $Rn^{222}$ ), Iod ( $I^{125}$ ) und Cobalt ( $Co^{60}$ ) (Houlton, 1983; Turrel et al., 1985). Indikationsgebiete der Radiotherapie sind insbesondere schwer zugängliche Regionen- zum Beispiel die Augen und deren unmittelbare Umgebung (Turrel et al., 1985).

Als Nachteil der Methode ist primär die hohe Strahlenbelastung und die daraus resultierende Gefährdung des Chirurgen zu nennen. Diese kann durch die "after loading technique" reduziert werden (Turrel und Koblik, 1983). Hierfür werden leere Applikatoren implantiert und erst nach einer Lagekontrolle mit radioaktiven Strahlenquellen versehen. Neben der Erfordernis, das medizinische Personal für den Umgang mit radioaktivem Material zu qualifizieren, sind spezielle Anforderungen an die Strahlenschutzbestimmungen bezüglich der Haltung der Patienten erforderlich (Carstanjen und Lepage, 1998). Theon und Kollegen empfahlen für Tumoren mit einem Durchmesser ab 5 cm eine vorherige chirurgische Entfernung, da die Strahlendosis sonst nicht ausreichen würde (Theon und Pascoe, 1994). Nicht zuletzt sind als Gegenargumente der lange Behandlungszeitraum über durchschnittlich 3 Tage und die langwierige Tumorregression, in einem Zeitraum von bis zu einem Jahr, zu nennen (Carstanjen und Lepage, 1998). Lokale Nebenwirkungen wie Schwellungen, Erytheme, Infektionen und Fibrosen wurden beobachtet (Theon und Pascoe, 1994). Als weitere unerwünschte Effekte sind Leukotrichose und Alopezie zu erwähnen (Walker et al., 1991; Vrins et al., 1992; Theon und Pascoe, 1994). Aufgrund der synergistischen Wirkungen wird eine Kombinationstherapie mit der Elektrotherapie empfohlen, die durch Zellzerstörung die Wirkung der Strahlentherapie fördert (Turrel et al., 1985; Brewer und Turrel, 1982). Die Erfolgsraten der Strahlentherapie sind durch verschiedene Autoren mit 50%-100% angegeben. Es wurde vermutet, dass diese variierenden Angaben auf verschiedene Parameter, wie Tumorgöße, verwendetes Radioisotop und Strahlungs-dosis zurück zu führen sind (Carstanjen und Lepage, 1998). Knottenbelt beschrieb die Radiotherapie als die erfolgreichste Methode zur Behandlung equiner Sarkoide. Er betonte jedoch, dass sie aufgrund der damit verbundenen Gefahren ein Mittel letzter Wahl darstellt (Knottenbelt, 2003).

## 2.10 Immuntherapie

Ziel der Immuntherapie ist es, die körpereigene Immunabwehr zu aktivieren. Dies kann unspezifisch erreicht werden, beispielsweise über die Verabreichung von Immunmodulatoren. Im Gegensatz dazu wird unter der spezifischen Immuntherapie die Abwehr, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist, verstanden.

Im Folgenden werden die in der Literatur häufig erwähnten immunologischen Therapieformen beschrieben. Die Methode der in dieser Arbeit angewendeten zellbasierten Therapie mittels dendritischer Zellen wird gesondert am Ende dieses Kapitels beschrieben (siehe Abschnitt 2.10.3).

### 2.10.1 Immunmodulatoren

In der Tumorthherapie werden die nachfolgend beschriebenen Methoden zur Aktivierung des Immunsystems häufig verwendet. Diese basieren auf der Anwendung von

- BCG-Vakzinen,
- Interleukin-2,
- BPV-Proteinen.

#### BCG-Vakzine

Die BCG-Vakzine (*Bacillus-Calmette-Guérin*) enthält einen attenuierten Stamm von *Mycobacterium bovis* (Murphy et al., 1979), dessen lokale Anwendung eine unspezifische zelluläre Immunität induziert (Murphy et al., 1979; Vanselow et al., 1988; Lavach et al., 1985). Es kann zwischen der Verwendung von 3 Varianten unterschieden werden (Wyman et al., 1977; Bast et al., 1974a,b; Vanselow et al., 1988):

- lebende BCG-Organismen,
- inaktivierte BCG-Organismen,
- BCG-Zellwand-Fraktionen.

Zur Verlangsamung der Freisetzung und zur Verstärkung der Wirkung werden Emulsionen mit verschiedenen Adjuvantien, zum Beispiel Ölen, hergestellt (Bast et al., 1974a; Lavach et al., 1985). Die Wirksamkeit der Vakzine ist nach Murphy und Kollegen von der Aufbereitung und Konzentration der BCG-Vakzine, der Applikationsart, dem Tumortyp und dessen Lokalisation abhängig (Murphy et al., 1979). Darüber hinaus beschrieben Marti und Kollegen eine Abhängigkeit von der Größe des Tumors und der Anzahl der Tumoren (Marti et al., 1993). Vorteile der ausschließlichen Verwendung von Bestandteilen der Zellwand liegen in der reduzierten Gefahr anaphylaktischer Reaktionen (Owen und

Jagger, 1987) und bringen nach Untersuchungen von Bertone und McClure bessere Heilungserfolge (Bertone und McClure, 1990). Die Verwendung lebender BCG-Organismen kann zur Ausbildung lokaler Nebenwirkungen, wie Schwellungen, Entzündungen und Ulzerationen führen (Murphy et al., 1979). Zudem besteht besonders bei einer wiederholten Applikation die Gefahr des Auftretens schwerwiegender systemischer Reaktionen. Hierbei können erhöhte Körpertemperatur, Anorexie, gestörtes Allgemeinbefinden, anaphylaktische Reaktionen und ein anaphylaktischer Schock auftreten (Lavach et al., 1985; Vanselow et al., 1988). Vanselow und Kollegen empfahlen im Falle einer wiederholten BCG-Vakzinierung eine Prämedikation mit Flunixin-Meglumin (1,0 mg/kg, intravenös) und Prednisolon (2,0 mg/kg, intramuskulär), die 30 Minuten vor der BCG-Applikation erfolgen sollte, um gefährliche anaphylaktische Reaktionen zu verhindern (Vanselow et al., 1988). Knottenbelt beschrieb mögliche Verschlechterungen des Zustandes bei der Behandlung fibroblastischer Sarkoide (Knottenbelt, 2003).

Die Anzahl der durchzuführenden BCG-Injektionen variiert bei den verschiedenen Autoren. Brandt und Kollegen empfahlen eine zweimalige Injektion im Abstand von zwei Wochen mit anschließender chirurgischer Entfernung (Brandt et al., 1996). Andere Autoren führten drei bis fünf Injektionen im Abstand von zwei bis vier Wochen durch (Murphy et al., 1979; Lavach et al., 1985; Vanselow et al., 1988). Da Tumore mit großer Oberfläche nicht oder nur bedingt auf die BCG-Vakzinierung reagieren, wird in vielen Studien eine chirurgische Verkleinerung der Tumoren empfohlen (Owen und Jagger, 1987; Vanselow et al., 1988). Klein beschrieb ein gutes Ansprechen von Tumoren mit einem maximalen Volumen von  $10 \text{ cm}^3$ . Bei Tumoren mit einer Oberfläche von mehr als  $50 \text{ cm}^2$  reagieren hingegen nur noch die Hälfte der Tumore auf die BCG-Vakzinierung (Klein, 1987). Die in der Literatur angegebenen Erfolgsraten variieren zwischen 48% und 59%. Wobei von einigen Autoren höhere Heilungsraten am Auge betont wurden (Bertone und McClure, 1990; Marti et al., 1993; Brandt et al., 1996; Martens et al., 2000a).

### **Interleukin-2**

Die Anwendung von Interleukin-2 führt zum Wachstum aktivierter T-Lymphozyten und B-Lymphozyten und stimuliert natürliche Killerzellen (Roitt, 1993). In der Human- und Veterinärmedizin hat sich die lokale

Anwendung von IL-2 in der Tumorthherapie in einigen Fällen als effektiv und ohne Ausbildung schwerer Nebenwirkungen erwiesen (Spoormakers et al., 2003). Bei systemischen Verabreichungen von Interleukin-2 können schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Aszites und Dyspnoe auftreten (Peace und Cheever, 1989).

Spoormakers und Kollegen behandelten Sarkoide von 21 Pferden ausschließlich mit intratumoralen Injektionen von Interleukin-2 (IL-2) über einen Zeitraum von 5 oder 10 Tagen. Es konnten nur bei 18% bzw 10% der behandelten Pferde eine totale Tumorregression beobachtet werden. Weitere 14 betroffene Pferde und ein Esel erhielten am Tag 0 intratumorale Injektionen von Cisplatin und am Tag 10 intratumorale Injektionen von IL-2. 53% der behandelten Tiere zeigten eine komplette Regression der behandelten Tumore. Bei der alleinigen Therapie mit Interleukin-2 wurden minimale Nebenwirkungen, wie leichte Rötung und geringgradige Ödembildung beobachtet. Die Patienten, die mit IL-2 und Cisplatin behandelt wurden, zeigten lokale Rötungen und Ödeme mit Krustenbildung, die länger anhielten (Spoormakers et al., 2003).

### **BPV-Proteine**

BPV-Proteine stützen sich hingegen nach Johne und Kollegen im Rahmen der Immunisierung auf das Vorhandensein von BPV 1 in equinen Sarkoiden (Johne et al., 2004). Sie beschrieben in ihrer Studie mit 12 Pferden den Einsatz der BPV-Proteine L1 und E7 in Form von so genannten "chimären virusähnlichen Partikeln" (CVLP), die eine starke immunogene Wirkung aufweisen, jedoch kein infektiöses Virusmaterial enthalten. Es wurden zwei tiefe intramuskuläre Injektionen in die Brustmuskulatur im Abstand von zwei Wochen durchgeführt, die zum Teil durch eine Wiederholungsimpfung nach vier Monaten ergänzt wurden. Einige Pferde zeigten eine Tumorregression, wobei bei einigen Tieren, während des Beobachtungszeitraumes, gleichzeitig das Wachstum neuer Tumore beobachtet werden konnte. Die Autoren gaben an, dass eine Korrelation zwischen den Ergebnissen und der Antikörperbildung sowie der Ausbildung einer zellulären Immunität vorlag (Johne et al., 2004). Die Studie wurde jedoch nicht weitergehend publiziert und scheint auch kommerziell nicht weiter verfolgt zu werden.

### 2.10.2 Autologe Vakzine

Autologe Vakzine dienen zur Aktivierung des Immunsystems gegen ein bestimmtes Antigen, werden aus dem körpereigenen Material gewonnen und dem Patienten anschließend injiziert. Ziel ist es, mittels Tumoran-tigenen eine zellinduzierte Immunität gegen Sarkoide zu erreichen (Carstanjen und Lepage, 1998).

Bereits 1970 berichtete Roberts über seine Ergebnisse der Verwendung tiefgefrorenen, sterilisierten autologen Tumormaterials bei der Behandlung equiner Sarkoide. Neben einer kompletten Remission aller Tumore bei vereinzelt Patienten, zeigten einige Pferde mit verstärkter Sensitivität gegenüber der Vakzine, eine Verschlimmerung der Symptome (Roberts, 1970). Diese möglichen Reaktionen erwähnten auch andere Autoren (Knottenbelt und Walker, 1995).

Es wurden mehrere Studien publiziert, welche gute Erfolge in der Behandlung equiner Sarkoide durch Verwendung autologer Vakzine nennen. Das Tumormaterial wurde zum Teil tiefgefroren (Vanselow et al., 1988) oder speziell homogenisiert und gefiltert (Tallberg et al., 1994). Aichinger berichtete in ihrer Studie über die spezielle Aufbereitung der Tumorzellmembranen und dem Zusatz von Adjuvantien, wie Tuberkulin oder Utilin S als Indikatoren für die Dauer der Wirkung der Vakzine. Zusätzlich wurden den Patienten oral Folsäure und Zink-Tetrachlorid verabreicht. In dieser Studie mit 9 Pferden wurde eine Remissionsrate von 100% festgestellt (Aichinger, 1998). Allen publizierten Studien fehlen aber weitergehende Studien, die die Wirkung näher untersuchen und einzelne Sarkoidtypen vergleichen.

### 2.10.3 Zellbasierte Immuntherapie von Tumoren

In diesem Abschnitt wird die Form der Immuntherapie beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fand. Diese zellbasierte Immuntherapie beruht auf der Verwendung autologer dendritischer Zellen und ist als spezifische Immuntherapie zu sehen, die gegen bestimmte Tumoren gerichtet ist. Zunächst wird im Folgenden auf die Eigenschaften der dendritischen Zellen (DC) und ihre Aufgaben im Immunsystem eingegangen. Anschließend wird eine Übersicht über die Verwendung dendritischer Zellen in der Therapie gegeben. Dazu werden die Ergebnisse human- sowie veterinärmedizinischer Studien zum therapeutischen Einsatz der DC zusammengefasst.

### **Eigenschaften dendritischer Zellen**

Dendritische Zellen gehören zu den so genannten professionellen antigen-präsentierenden Zellen, die eine zentrale Bedeutung bei der Initiierung von Immunantworten haben (Peters et al., 1996). Steinman und Cohn beschrieben dendritische Zellen erstmals 1973 in murinen Lymphknoten und der Milz als langgestreckte Zellen mit Ausläufern (Steinman und Cohn, 1973). Sie benannten die Zellen nach dem griechischen Wort *dendron* (Baum). DC sind vor allem in Lymphgeweben (Milz, Lymphknoten, Thymus und afferente Lymphbahnen) und peripheren Geweben präsent, in denen sie in engem Kontakt mit der äußeren Umgebung stehen (Haut, Verdauungs- und Respirationstrakt) (Banchereau und Steinman, 1998; Flores-Langarica et al., 2005). Sie werden zum angeborenen Immunsystem gezählt (Lipscomb und Masten, 2002).

### **Herkunft und Entwicklung dendritischer Zellen**

Die Abstammung der DC aus dem Knochenmark ist seit längerer Zeit bekannt (Steinman, 1991). Ihre Eingliederung in die hämatopoetische Reihe (Abstammung der Zellen des blutbildenden Systems) war lange umstritten. Die gemeinsame Vorläuferzelle aller Blutzellen sind die im Knochenmark vorkommenden pluripotenten Stammzellen, die bereits CD34 tragen. Aus ihnen entwickeln sich myeloische und lymphatische Vorläuferzellreihen (Peters et al., 1996). Zu geringen Anteilen können DC auch von lymphoiden Stammzellen abstammen (Manz et al., 2001). DC aus lymphoiden Vorstufen können im Vergleich zu DC aus myeloiden Vorstufen die gleiche Potenz der T-Zellstimulation durch Antigenpräsentation aufweisen (Manz et al., 2001). Inwieweit es sich hier um eine reverse Differenzierung handelt, ist derzeit unklar. Lymphoide DC sollen an dieser Stelle auch nicht weiter thematisiert werden. Um die Spezifität der Immunantwort zu gewährleisten, besitzt das Immunsystem ruhende unreife, sternförmige DC (immature DC, zum Beispiel Langerhans Zellen) und aktivierte reife DC (mature DC, mDC) (siehe Tabelle 2.1).

Der Status der Reifung (Maturation) der dendritischen Zellen zeichnet sich durch eine variable Morphologie dieser Zellen aus (siehe Tabelle 2.1). Die Aktivierung der dendritischen Zellen erfolgt durch Gefahrensignale, welche unter anderem von Zellen freigesetzt werden,

die durch Nekrose oder Infektion, nicht aber im Rahmen des physiologischen Zellunterganges zerstört wurden (Matzinger, 1994; Lipscomb und Masten, 2002). Gefahrensignale können zum Beispiel Bakterien bzw. Komponenten der bakteriellen Zellwand (z.B. Lipopolysaccharide und Peptidoglykane) darstellen (Jungi, 1996; Banchereau und Steinman, 1998; Wallet et al., 2005). Weiterhin existieren maturations-hemmende Faktoren, wie Interleukin-10 und  $TNF/\beta$ , welche vermutlich von einigen Tumorzellen exprimiert werden (Banchereau und Steinman, 1998; Crittenden et al., 2005; Wallet et al., 2005).

Lokalisation	Morphologie	Aufgabe	Status
Peripheres Gewebe	sternförmig	Antigenaufnahme und Prozessierung	unreif / immatur
Afferente Lymphbahnen	Schleierzellen / veiled cells	Antigentransport	reifend
Milz / Lymphknoten	interdigitierend	Antigenpräsentation	reif / matur

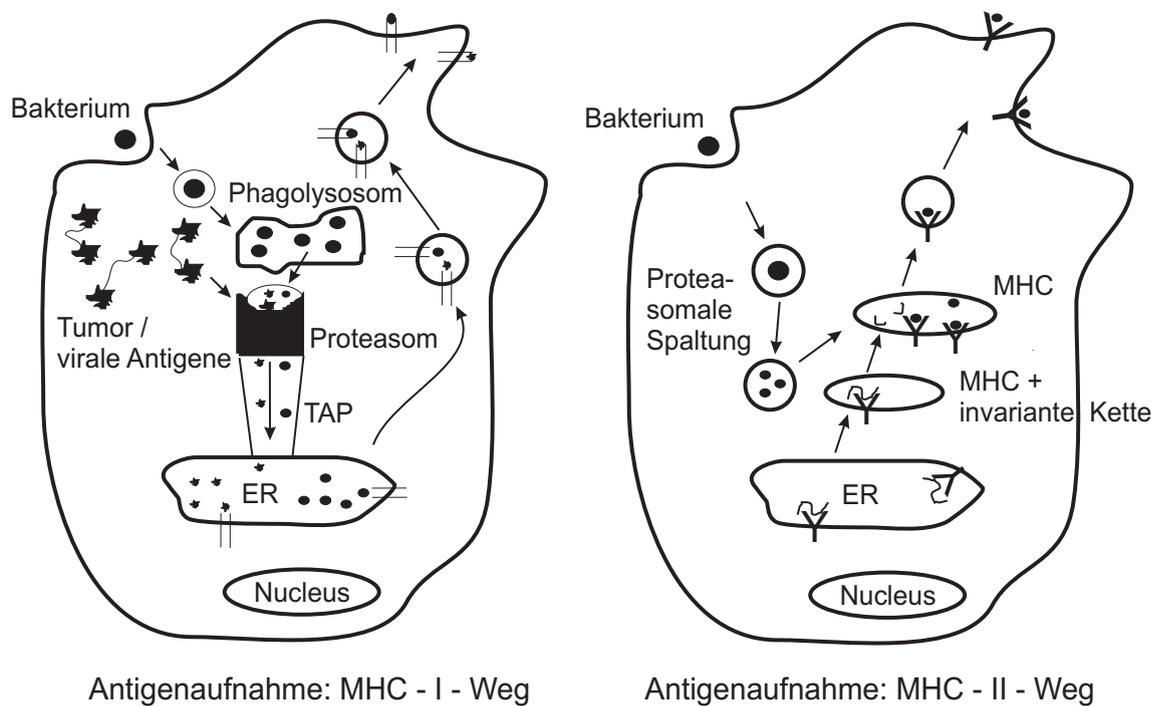
**Tabelle 2.1:** Nomenklatur und Aufgaben dendritischer Zellen. (nach Steinbach und Kollegen 1998)

DC nehmen als noch unreife (immature) dendritische Zellen (iDC) Antigene durch Pinozytose, Phagozytose oder Makropinozytose in ihre Endosomen auf und prozessieren sie dort (Reis e Sousa et al., 1993; Filgueira et al., 1996; Banchereau und Steinman, 1998; Steinman, 2001). Aufgenommene Antigene können Immunkomplexe, Bakterien, Viren, Parasiten sowie Zellen nach ihrem apoptotischen Untergang infolge einer Infektion sein (Steinman et al., 2000; Lipscomb und Masten, 2002; Flores-Langarica et al., 2005). Immature dendritische Zellen haben lange, dünne Zellausläufer, die für die große Oberfläche verantwortlich sind und über eine große Rezeptordichte zur Antigenaufnahme verfügen (Bell et al., 1999). Zu den Antigen-Erkennungsrezeptoren der iDC gehören zum Beispiel der Mannose-Rezeptor und die Fc-Rezeptoren.

Intrazellulär werden die Antigene durch enthaltene proteolytische Enzyme in Peptide gespalten und nachfolgend in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dieser Transport wird durch das TAP-Gen (Transporter associated with Antigen Processing) ermöglicht. Das TAP-Gen kodiert ein Protein, das den ATP-abhängigen Transport der Peptide in das ER gestattet (Jungi, 2000). Die invariante Kette des im endoplasmatischen Retikulum synthetisierten MHC-II Moleküls wird durch die endosomalen Proteasen abgespalten, wodurch das antigene Peptid an-

binden kann. Der entstandene Peptid-MHC-II-Komplex wird nach Fusion mit der Plasmamembran auf der Zelloberfläche präsentiert (siehe Abbildung 2.10.3), (Babbitt et al., 1985; Lipscomb und Masten, 2002). Gelangen Proteine in das Zytosol, werden sie durch Proteasomen proteolytisch in Peptide gespalten und nachfolgend in das ER geschleust. Die Peptide werden mit den dort synthetisierten MHC-I Molekülen zu einem Peptid-MHC-Komplex-Klasse I assoziiert (siehe Abbildung 2.10.3). Der so gebildete Komplex wird durch das, ebenfalls aus dem ER stammende, Beta-2-Mikroglobulin ( $\beta 2M$ ) stabilisiert. In Vesikeln des Golgi-Apparates werden die Peptid-MHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert und von den cytotoxischen T-Zellen als Antigen erkannt (Yewdell und Bennink, 1992; Jungi, 2000; Lipscomb und Masten, 2002). Im Vergleich zu anderen antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel den Monozyten oder den B-Zellen, sind DC in der Lage mit höherer Geschwindigkeit eine größere Anzahl an MHC-Peptid-Komplexen an ihre Oberfläche zu transportieren (Banchereau und Steinman, 1998), (Hammond et al., 1999).

Nach erfolgter Antigenaufnahme und Aktivierung unterliegen DC Veränderungen, der so genannten *Maturation*, die sich auf die Morphologie, den Phänotyp und die Funktion der Zellen auswirkt. Dieser Vorgang geht mit der Hochregulation der Oberflächenmoleküle MHC-II, CD40, CD54, CD80, CD86 auf ihrer Zelloberfläche und der Sekretion der proinflammatorischen Enzyme wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 und IL-23 einher (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Reife DC verlieren die Fähigkeit Antigene aufzunehmen und reifen zu immunstimulatorischen Zellen (Lipscomb und Masten, 2002). Beim Eintritt in die afferenten Lymphgefäße verändern sie ihre Form und werden als "*veiled cells*" oder Schleierzellen bezeichnet. "Veiled cells" sind durch verlängerte Zellausläufer gekennzeichnet, die eine besondere Motilität der Zellen unterstützen, wodurch sie in der Lage sind, über afferente Lymphbahnen und Blutgefäße zu den lymphatischen Organen, wie den regionalen Lymphknoten und der Milz, zu wandern (siehe Tabelle 2.1) (Spry et al., 1980; Kimber und Cumberbatch, 1992; Steinman et al., 2000; Peebles Jr. und Graham, 2001; Lipscomb und Masten, 2002; Wallet et al., 2005). In dem lymphatischen Gewebe angelangt, werden die Antigene den B- und T-Zellen präsentiert. In diesem Stadium können die - nun *interdigitierende DC* genannte Zellen - keine Antigene mehr aufnehmen (siehe Tabelle 2.1) (Roitt, 1993; Banchereau und Steinman, 1998; Hammond et al., 1999;



**Abbildung 2.2:** Antigenaufnahme in iDC. Links ist der MHC-I-Weg beschrieben. Die Antigenaufnahme geschieht durch Phagozytose und rezeptor-vermittelte Endozytose. Es erfolgen eine Proteolyse durch Proteasomen, sowie der aktive Transport, gesteuert durch das TAP-Gen in das ER (endoplasmatisches Retikulum) und nachfolgende Bindung an MHC-I-Moleküle zu Peptid-MHC-Komplex-Klasse I, welche dann vesikulär an die Zelloberfläche transportiert werden. Endogene Proteine werden ebenso proteosomal gespalten und nehmen folgend den gleichen Weg wie aufgenommene Antigene. Rechts ist der MHC-II-Weg beschrieben. Antigene werden durch Phagozytose, rezeptor-vermittelte Endozytose und Pinozytose aufgenommen und proteosomal in Peptide gespalten, welche an MHC-II-Moleküle zu Peptid-MHC-Komplex-Klasse II gebunden und an die Zelloberfläche transportiert werden. MHC-II Moleküle werden im ER synthetisiert, wo zudem die invariante Kette des Moleküls abgespalten wird (nach Lipscomb 2002).

Lipscomb und Masten, 2002). Die Auslösung der Immunantwort durch die Antigenpräsentation führt zu einer intensiven T-Zell-Proliferation (Young et al., 1992; Peebles Jr. und Graham, 2001).

Im Rahmen einer primären Immunreaktion sind nur immature DC in der Lage naive T-Zellen, welche noch keinen Antigenkontakt hatten, ausreichend zu aktivieren, da sie über alle notwendigen Rezeptoren in der ausreichenden Dichte verfügen (Banchereau und Steinman, 1998). DC können auch eine Toleranz gegen bestimmte Antigene induzieren. Dies tritt ein, wenn kostimulatorische Moleküle oder Gefahrensignale in nicht ausreichender Menge vorhanden sind, zum Beispiel im Rahmen des physiologischen Zellunterganges ohne gleichzeitiges Bestehen einer Entzündung. Die DC transportieren dann die gebundenen Peptide zu den Lymphknoten und präsentieren sie dort den T-Zellen ohne jedoch eine Proliferation der T-Zellen auszulösen (Steinman et al., 2000; Lipscomb und Masten, 2002; Steinman und Nussenzweig, 2002).

DC können phänotypisch anhand charakteristischer Oberflächenmarker von Monozyten und Makrophagen unterschieden werden. CD14 gilt als Differenzierungsmarker der myeloischen Reihe und wird von Monoblasten, Monozyten und den meisten Makrophagen exprimiert (Schuett und Schumann, 1993). Die monozytären DC besitzen als Oberflächenmarker CD1, CD86, CD40 und MHC-II. Diese Oberflächenmoleküle kommen bei Monozyten und Makrophagen nicht (CD1) oder nur in geringem Maße (CD86, CD40, MHC-II) vor (Peters et al., 1996).

### **Gewinnung dendritischer Zellen**

Seit 1987 wurden bereits mehrere Verfahren zur Herstellung von DC *in vitro* aus Monozyten beschrieben. Bei ersten Untersuchungen zur Kultivierung peripherer Blutmonozyten ohne Zugabe von Zytokinen (lösliche Mediatoren) oder Serum wurden akzessorische Zellen beschrieben, die eine erhöhte Stimulationskapazität für T-Zellen aufwiesen (Peters et al., 1987). Einzelne Zytokine stellen, aufgrund ihrer Fähigkeit den Phänotyp und die Funktion monozytärer Zellen zu modulieren, geeignete Stimuli für die Differenzierung monozytärer Zellen zu dendritischen Zellen dar (Lauener et al., 1990). Da die Entnahme von Stammzellen aus dem Knochenmark ein sehr invasives Verfahren darstellt, wurde versucht dendritische Zellen aus dem peripheren Blut zu gewinnen. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass Monozyten aus dem Blut unter Zusatz von GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenzieren (Porcelli et al.,

1992; Steinbach et al., 1995; Peters et al., 1996; Banchereau und Steinman, 1998; Hammond et al., 1999; Rice et al., 2004). Weitere Studien zeigten, dass bereits geringe Mengen von GM-CSF (200 U/ml) und IL-4 (50 U/ml) ausreichen, um Monozyten zu stimulieren, die innerhalb von 4 Tagen zu monozytären DC differenzieren (Porcelli et al., 1992; Steinbach et al., 1995). GM-CSF induziert die Differenzierung von Monozyten und von DC (Inaba et al., 1992). Durch IL-4 kommt es zur Anreicherung und Verlängerung der Lebensdauer von DC (Rougier et al., 1998). In der systemischen Applikation von Zytokinen sehen einige Autoren eine mögliche erfolgreiche Tumorthherapie. So konnte in einer humanmedizinischen Studie an Patienten mit Melanomen durch wiederholte subkutane Injektion von GM-CSF eine Erhöhung der Anzahl peripherer DC erreicht werden (Demir et al., 2003). Die Aktivitätssteigerung der antigenpräsentierenden Zellen konnten in weiteren humanmedizinischen Studien an Tumorpatienten durch die Verabreichung von GM-CSF und IL-4 erreicht werden (Roth et al., 2000; Kiertscher et al., 2003).

### **Dendritische Zellen in der Therapie**

Grundlagen für therapeutische Anwendungen der DC sind die Fähigkeiten der DC, Antigene aufzunehmen, zu präsentieren und primäre Immunantworten zu induzieren (Jungi, 2000). Einsatzgebiete der DC bestehen für alle Bereiche des Immunsystems. Zum einen kann die Induktion einer Immunantwort bei bakteriellen oder viralen Infektionen und zum anderen die Ausbildung einer Toleranz gegen Antigene im Falle von Autoimmunerkrankungen ausgenutzt werden (Schlamp, 2005). Für die Tumorthherapie besteht die Grundlage, DC ex vivo mit tumorrelevantem Antigen zu beladen, zu aktivieren und in den Körper zurückzugeben. Ziel ist dabei, dass eine Immunreaktion gegen den Tumor induziert wird. DC werden dafür meist als Vakzine eingesetzt. Für die Herstellung einer Vakzine in vitro müssen zunächst DC aus monozytären Zellen aus dem peripheren Blut extrahiert werden. Im Anschluss wird den inaktiven DC das Antigen, gegen das eine Immunantwort induziert werden soll, in einer Zellkultur zugeführt. Für die Beladung der dendritischen Zellen mit dem Tumorantigen wurden verschiedene Strategien entwickelt. Es kamen Tumorlysate, apoptotische Tumorzellen, Tumorpeptide, Tumor-RNA, Tumor-DNA, Liposomen mit Nukleinsäuren oder Tumorantigen in viralen Vektoren zum Einsatz (Banchereau und Steinman, 1998; Fields et al., 1998; Nestle et al.,

1998; Celluzzi et al., 1996; Goldszmid et al., 2003; Pinzon-Charry et al., 2005). Tumore bestehen meist aus heterogenen Zellpopulationen und exprimieren ein breites Spektrum an Tumorantigenen. Oft ist nicht bekannt, welches dieser Antigene eine potente T-Zell-Antwort hervorrufen kann. Daher wird die Verwendung eines Tumorlysates, basierend auf allen Bestandteilen des Tumorgewebes, empfohlen (Schnurr et al., 2001). Die Beladung der DC mit nur einem Tumorantigen kann in der Therapie eines Tumors erfolglos sein und unter Umständen das Tumorwachstum durch vorhandene Escape-Mechanismen induzieren (Schnurr et al., 2001). Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Verwendung einer, auf einem Tumorantigen basierenden, DC-Vakzine auch Immunantworten gegen andere Tumorantigene induzieren kann (Brossart et al., 2000). Die Autoren vermuteten, dass die Zerstörung von Tumorzellen durch antigenspezifische T-Zellen zu einer Induktion anderer antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen führen kann. (Brossart et al., 2000). Gefahren werden in der Induktion von Autoimmunreaktionen aufgrund der Verwendung ganzer Gewebeportionen gesehen (Ludewig et al., 2000). Dies konnte in bisherigen klinischen Studien jedoch nicht belegt werden (Nestle et al., 1998; Liau et al., 2005).

Erste *humanmedizinische klinische Studien* wurden Mitte der 90er Jahre publiziert. Hsu und Kollegen führten 1996 bei vier Menschen mit Lymphomen wiederholte subkutane Injektionen von Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen durch und konnten sowohl partielle als auch komplette Tumorregressionen erreichen (Hsu et al., 1996). Seitdem wurden in der Humanmedizin weltweit klinische Studien initiiert, in deren Mittelpunkt eine Immuntherapie mit dendritischen Zellen steht. Zum Einsatz kommen dabei dendritische Zellen, die abhängig von der Erkrankung, spezifisch gepulst werden. Zahlreiche Studien zur Tumorthherapie (Bekämpfung von Brustkrebs, Prostata- und Nierenkarzinomen sowie von Melanomen) sind publiziert worden, in denen behandelte Patienten nach der Therapie eine partielle oder komplette Regression der Tumoren zeigten (Murphy et al., 1999; Mackensen et al., 2000; Gitlitz et al., 2003; Morse et al., 2003; Yamanaka et al., 2005; Khan und Yaqin, 2006). In Einzelfällen wurde kein Ansprechen auf die Therapie festgestellt (Schott et al., 2002). Goldszmid und Kollegen beschrieben in ihrer Studie über die Therapie von B16-Melanomen mittels DC als entscheidenden Punkt

für den Erfolg der Therapie, die Co-Kultur von DC mit apoptotischen Tumorzellen. Nach Impfungen mit einem Gemisch von dendritischen Zellen und Tumorzellen, ohne vorherige Co-Kultur, zeigten bis zu 9% der geimpften Mäuse eine tumorfreie Überlebenszeit, wohingegen die Impfungen mit co-kultivierten Tumorzellen und DC bei bis zu 80% der geimpften Mäuse zu einer tumorfreien Überlebenszeit führten. Weiterhin konnte mit der Co-Kultur von DC und Tumorzellen bei 80% der behandelten Mäuse ein immunologischer Memory-Effekt erreicht werden. Die erreichte Immunität war streng auf die Tumorart B16-Melanom begrenzt (Goldszmid et al., 2003).

In der *Veterinärmedizin* sind Untersuchungen zu dendritischen Zellen bislang vergleichsweise selten. Studien wurden vor allem bei Mäusen durchgeführt (Mayordomo et al., 1995; Celluzzi et al., 1996). Doch auch die dendritischen Zellen anderer Tierarten sind Gegenstand einiger Studien. So wurden bereits 1989 DC in afferenten Lymphbahnen von Schafen untersucht (Bujdoso et al., 1989; Hopkins et al., 1989). Bei Rindern wurden DC aus Lymphknoten (McKeever et al., 1991) sowie aus dem peripheren Blut isoliert (Howard et al., 1999). Es erfolgten ebenso Untersuchungen zur Rolle der dendritischen Zellen im Rahmen von Infektionskrankheiten. So beschrieben Carrasco und Kollegen die Gefahr der Infektion und der Replikation von Pestiviren in dendritischen Zellen (Carrasco et al., 2004). Denn diese klassischen monozytotropen RNS-Viren verfügen über die Fähigkeit der funktionellen Störung dendritischer Zellen um so eine Immunantwort zu unterdrücken. In einer anderen Studie an Mäusen gelang es, eine moderate Immunantwort gegen das Border Disease Virus (BDV) hervorzurufen, indem BDV-gepulste DC injiziert wurden (Fassnacht et al., 2004). In Untersuchungen von Freer und Kollegen konnten feline DC unter Zugabe von feline IL-4 und feline GM-CSF aus dem peripheren Blut von Katzen gewonnen werden (Freer et al., 2005). Den Autoren gelang zudem der Nachweis einer deutlichen DC-Maturation durch Zugabe von aus *Escherichia coli* gewonnenem LPS. Hier können mögliche Anwendungsgebiete bei FIV-Infektionen (Felines Immundefizienzvirus) gesehen werden (Freer et al., 2005). Auch bei anderen Tierarten, wie Hunden und Schweinen, wurden bereits unter Zusatz von IL-4 und GM-CSF Zellen mit dendritischer Morphologie und Funktionalität isoliert (Renjifo et al., 1997; Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001; Bonnefont-Rebeix et al., 2006). Darin

sind erste Schritte in einer möglichen Therapie von Erkrankungen bei den einzelnen Tierarten zu erkennen.

Trotz der nachgewiesenen entscheidenden Rolle der dendritischen Zellen in der Initiierung einer Immunantwort in anderen Spezies, existieren bislang nur wenige Studien über *equine DC*, die im Folgenden zusammengefasst werden. So beschrieben Siedek und Kollegen 1997 die erste Isolierung equiner DC aus dem Blut gesunder adulter Pferde (Siedek et al., 1997). 1999 nannten Hammond und Kollegen erstmals die Differenzierung einer größeren Menge DC aus dem Blut von Ponies durch Zugabe von rekombinantem humanen GM-CSF und rekombinantem equinen IL-4 (Hammond et al., 1999). Nach 3-8 tägiger Kultivierung von peripheren Blutmonozyten unter Zugabe genannter Zytokine zeigten die stimulierten Zellen Eigenschaften dendritischer Zellen. Phänotypische und funktionelle Untersuchungen wiesen ein Gemisch reifer (mature) und unreifer (immature) DC nach, die bis zu 14 Tage überlebensfähig waren. Nach Zugabe der Zytokine waren die equinen DC in der Lage, sehr zügig flüssige oder partikuläre Antigene aufzunehmen (Hammond et al., 1999). Allerdings unterscheidet sich das dort verwendete Protokoll erheblich von den sonst für andere Spezies eingesetzten. Neben der genannten Isolation equiner DC, erfolgten bereits verschiedene Untersuchungen zur Rolle der Auslösung einer Immunantwort durch DC. So konnten Steinbach und Kollegen murine DC mit EHV-1 infizieren und eine protektive antivirale Immunität in vivo induzieren (Steinbach et al., 1998). In einer anderen Studie gelang es, beim Pferd in vitro nach equiner Herpesvirus 1 (EHV-1) Infektion die durch DC stimulierte T-Zell-Proliferation und T-Zell-Toxizität zu zeigen (Siedek et al., 1999). Auch die besondere Bedeutung der DC im Rahmen der VEE-Infektion (Venezuelan Equine Encephalitis Virus) konnte nachgewiesen werden (MacDonald und Johnston, 2000). Diese Infektion der Equiden, welche durch *Togaviridae* hervorgerufen wird, kommt insbesondere in Mittel- und Südamerika vor und wird durch Arthropoden übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass DC das primäre Ziel der VEE-Viren darstellen (MacDonald und Johnston, 2000).

In jüngster Zeit wurden in dem Bereich der Pferdeimmunologie, insbesondere bei der Klonierung relevanter Zytokine sowie der Charakterisierung myeloider Zellen, erhebliche Fortschritte gemacht, die in der Durchführung dieser bereits im Jahr 2001 begonnenen klinischen Arbeit auch durch persönliche Kommunikation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Falko Steinbach in Berlin allgemeine Berücksichtigung, zum Beispiel im Protokoll zur Herstellung der DC, finden konnten (Saalmueller et al., 2005; Steinbach et al., 2005; Mauel et al., 2006). Allerdings war es nicht mehr möglich, die Protokolle zur weitergehenden Charakterisierung der Monozyten und DC im Rahmen dieser Studie anzuwenden.

## 2.11 Zielstellung

Das Equine Sarkoid ist der weltweit bei Pferden am häufigsten vorkommende Hauttumor. Neben der Existenz von notwendigen Kofaktoren gilt BPV als infektiöses Agens. Da Sarkoide aufgrund ihrer Lage und Ausdehnung zur Nutzungseinschränkung der erkrankten Pferde führen können, ist eine wirksame und sichere Therapie notwendig.

Diese Arbeit beschreibt den Einsatz autologer dendritischer Zellen (DC) bei Pferden mit equinen Sarkoiden nach erfolgter chirurgischer Entfernung im Sinne einer exploratorischen Studie. Ziel der Arbeit war es, eine autologe Vakzine aus Tumormaterial von Patienten unter Verwendung autologer DC herzustellen, anschließend zu applizieren und aus den klinischen Ergebnissen Aussagen über die Sicherheit und Wirksamkeit der angewendeten Methode zu gewinnen. Dazu wurden 21 Patienten im Zeitraum zwischen 2001 und 2004 nach dem gleichen Protokoll mit zwei Vakzinationen binnen sechs Wochen behandelt. Insbesondere war zu untersuchen, ob es zu außergewöhnlichen Reaktionen im Sinne von Nebenwirkungen kommt, zum Beispiel lokale Reaktionen an den Lokalisationen der Injektionen sowie generalisierte Symptome im Sinne allergischer Reaktionen, oder eine Verschlechterung des klinischen Verlaufs auftritt.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Patienten

In den Jahren 2001 bis 2004 wurden in der Tierklinik des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb GmbH) in Bad Langensalza insgesamt 21 Pferde mit equinen Sarkoiden in einheitlicher Weise behandelt. In diese Studie wurden ausschließlich Pferde einbezogen, bei denen nach einer oder mehreren Vorbehandlungen Rezidive aufgetreten waren. Es handelte sich um 11 Wallache und 10 Stuten verschiedener Herkunft und Abstammung. Es kamen 11 Warmblüter, sowie einzelne Tiere verschiedener Rassen vor. Die Details sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die vorgestellten Patienten waren zwischen drei und 17 Jahren alt. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Vorstellung in der Tierklinik des fzmb 7,2 Jahre. Die ausschließlich von den Haustierärzten durchgeführten Vorbehandlungen bestand in fast allen Fällen im Abbinden der Tumore, allein oder in kombinierter Form mit anderen Behandlungsmethoden. Bei fünf Patienten wurden zusätzlich eine oder mehrere weitere Vorbehandlungen durch den Haustierarzt wie folgt durchgeführt.

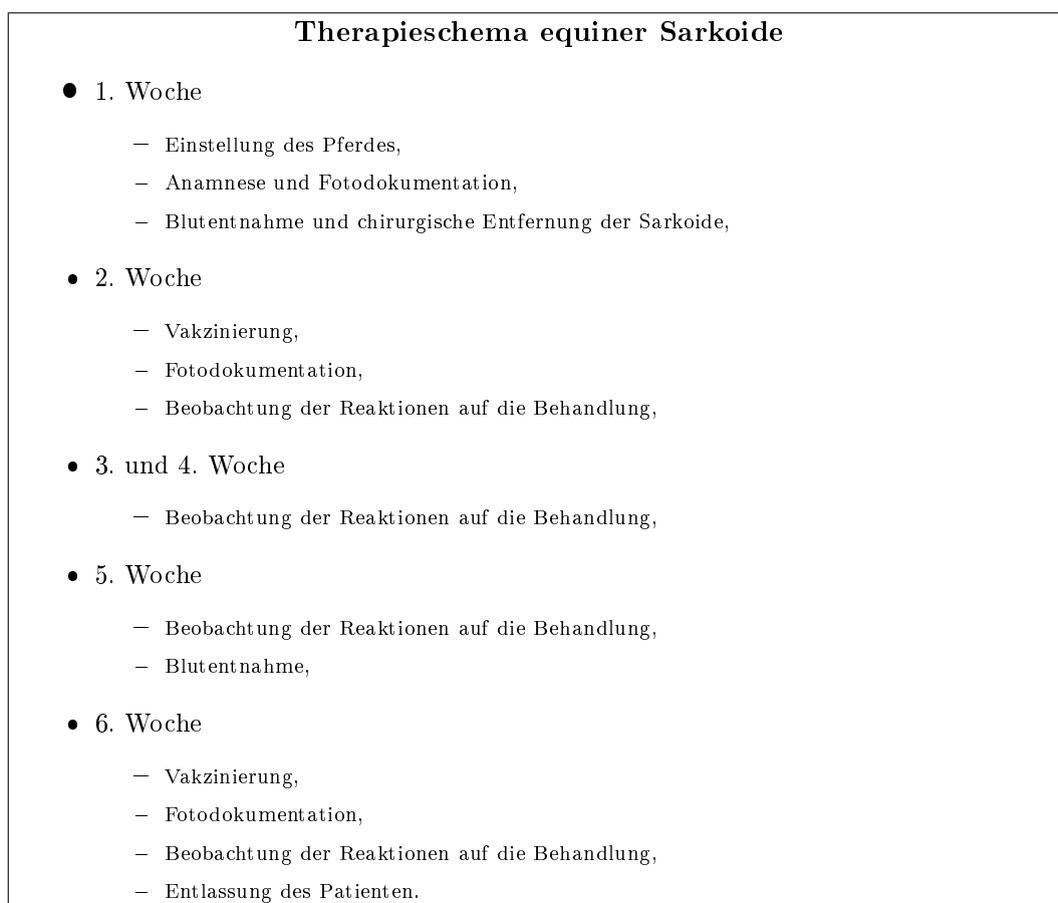
- Bei einem Pferd wurde lokal Zahncreme appliziert.
- Bei zwei Pferden wurden die equinen Sarkoide ausschließlich chirurgisch entfernt.
- Bei drei Pferden erfolgten eine chirurgische Entfernung der Sarkoide sowie zusätzlich folgende Behandlungen. Bei einem Pferd wurde zusätzlich Spinnengift und Homöopathie appliziert. Von zwei Pferden, bei denen zusätzlich eine Tumorlysatvakzine angewendet wurde, erhielt ein Pferd weiterhin eine Kryochirurgie.

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Farbe	Sarkoide seit / Methoden der Vorbehandlung
1	Haflinger	Wallach	7	Falbe	Sarkoide seit etwa 2 Jahren, Abbinden
2	Friese	Wallach	9	Rappe	Sarkoide seit etwa $\frac{1}{2}$ Jahr, Abbinden
3	Morgan Horse	Wallach	7	Dunkelfuchs	Sarkoide seit einem Jahr, Abbinden, Homöopathie, Spinnengift, chirurgische Entfernung
4	Warmblut	Stute	6	Fuchs	Sarkoide seit etwa einem Jahr, chirurgische Entfernung
5	Warmblut	Wallach	3	Fuchs	Sarkoide seit etwa 2 Jahren, Abbinden
6	Tinker	Stute	14	Schecke	Sarkoide seit etwa einem Jahr, chirurgische Entfernung
7	Painthorse	Wallach	8	Schecke	Sarkoide seit etwa 3 Jahren, Abbinden, chirurgische Entfernung, Tumorlysatvakzine
8	Warmblut	Stute	6	Braune	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden
9	Araber-Berber	Stute	5	Fuchs	Sarkoide seit etwa 2 Jahren, Abbinden
10	Warmblut	Stute	10	Fuchs	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden
11	Warmblut	Wallach	4	Brauner	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden
12	Warmblut	Wallach	5	Brauner	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden
13	Warmblut	Wallach	4	Brauner	Sarkoide seit etwa 2 Jahren, Abbinden
14	Warmblut	Stute	13	Braune	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden
15	Quarter Horse	Stute	8	Fuchs	Sarkoide seit einem Jahr, Abbinden, lokal Zahncreme
16	Warmblut	Wallach	7	Brauner	Sarkoide seit etwa 3 Jahren, Abbinden
17	Welsh-Pony	Stute	8	Fuchs	Sarkoide seit etwa 2 Jahren, Abbinden
18	Warmblut	Wallach	5	Fuchs	Sarkoide seit etwa 3 Jahren, Abbinden, Kryochirurgie, chirurgische Entfernung, Tumorlysatvakzine
19	Isländer	Wallach	8	Fuchs	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden
20	Warmblut	Stute	10	Rappe	Sarkoide seit etwa 2 Jahren, Abbinden, chirurgische Entfernung
21	Friese	Stute	5	Rappe	Sarkoide seit etwa einem Jahr, Abbinden

Tabelle 3.1: Patientenübersicht

## 3.2 Allgemeine Beschreibung der Therapie

Alle Pferde wurden nach dem gleichen Protokoll behandelt (siehe nachfolgendes Therapieschema, Abbildung 3.1). Sie wurden für den Behandlungszeitraum von 6 Wochen in der Tierklinik des fzmb GmbH Bad Langensalza eingestellt. Nach Eingewöhnung der Patienten erfolgten in der ersten Woche die klinische Untersuchung, die chirurgische Entfernung der Sarkoide unter Allgemeinanästhesie, wie im dem Abschnitt 3.3.1 beschrieben, sowie die Blutentnahme für die weitere Therapie (siehe Abschnitt 3.4). Post operativ wurden die Operationswunden, wie im Abschnitt 3.3.2 dargestellt, in regelmäßigen Abständen durch Wundtoiletten versorgt. In der 2. Woche wurde, wie im Abschnitt 3.4.5 erläutert, die hergestellte Vakzine intrakutan injiziert. In der 5. Woche erfolgte die zweite Blutentnahme für die Herstellung der Vakzine, die in der 6. Woche intrakutan injiziert wurde. Im Anschluss an die Entlassung der Patienten wurde der Heilungsverlauf anhand regelmäßiger Befragung der Besitzer ausgewertet.



**Abbildung 3.1:** Therapieschema equiner Sarkoide

### 3.3 Anamnese und klinische Untersuchung

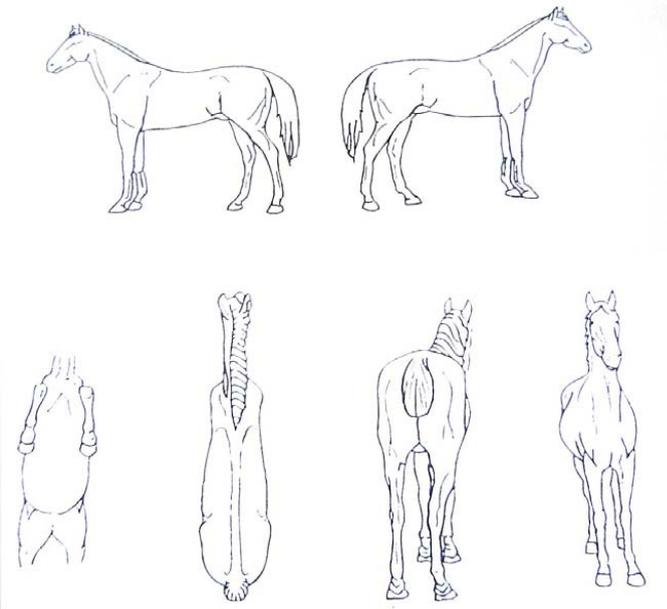
In den ersten Tagen nach der Einstellung wurden alle Patienten einer eingehenden Anamnese und einer allgemeinen klinischen Untersuchung, einer speziellen Untersuchung der Haut (siehe Abbildung 3.2, "Untersuchungsbogen Equine Sarkoide") einschließlich einer Fotodokumentation der equinen Sarkoide unterzogen. Für jede Lokalisation wurde die Anzahl der vorkommenden Sarkoide, deren Größe und deren Typ nach der Einteilung von Knottenbelt beschrieben (Knottenbelt, 2003). Informationen zum Krankheitsgeschehen lieferten die Angaben der Besitzer oder wurden von den Haustierärzten übermittelt.

#### 3.3.1 Chirurgische Entfernung der equinen Sarkoide

Zu Beginn erfolgte eine Narkosefähigkeitsuntersuchung, eine Überprüfung des aktuellen Impfstatus sowie die Anfertigung eines kleinen roten und weißen Blutbildes. Nach dem Legen des intravenösen Verweilkatheters (Braunüle MT<sup>®</sup> Luer Lock, Braun, Melsungen, 2G14), wurde ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (Phenylbutazon, 4,0 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Vor der Anästhesieeinleitung wurde jedem Patienten das Maul ausgespült. Die Sedation erfolgte mittels intravenöser Verabreichung von Romifidin (0,10 mg/kg Körpergewicht), die Einleitung der Narkose mit Ketamin (2,2 mg/kg Körpergewicht) und Diazepam (0,4 mg/kg Körpergewicht). Nach der Intubation des Pferdes mit einem Trachealtubus, wurde die Narkose mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch aufrechterhalten. Während der gesamten Operation wurde dem Pferd über eine Infusion in den Verweilkatheter eine isotonische Kochsalzlösung (10-40 ml/kg/Stunde) verabreicht. Für die Operation wurden die Pferde in Rücken- oder Seitenlage fixiert, das Operationsgebiet gewaschen, rasiert und desinfiziert sowie die Umgebung des Operationsfeldes mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die Entfernung der Sarkoide erfolgte mittels Elektrochirurgie (Elektrotom 541, Berchthold, Tuttlingen). Aufgetretene kleinere Blutungen konnten mit dem Elektrokauter koaguliert werden, größere eröffnete Blutgefäße wurden mit einer Naht verschlossen (Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt, 3,5 metric). Bei der Exzision wurde darauf geachtet, den gesamten Tumor bis in das umgebende gesunde Gewebe zu entfernen. Die Operationswunden wurden, je nach Lokalisation und Größe, mittels mehrschichtigen Wundnähten verschlossen oder unverschlossen gelassen. Im ersten Fall erfolgte der Wundver-

<b>Untersuchungsbogen „Equine Sarkoide“</b>		
<b>Signalement</b>		
	Name	
	Geburtsdatum	
	Geschlecht	
	Rasse	
	Fellfarbe	
	Besitzer	
<b>Anamnese</b>		
	Wann wurden die Sarkoide zuerst bemerkt?	
	- Alter des Pferdes zum Zeitpunkt der Feststellung:	
	- Zeitraum seit dem Zeitpunkt der Feststellung:	
	Sind Verletzungen oder Ähnliches vorausgegangen?	
	- Wenn ja, welche:	
	Existiert eine familiäre Häufung?	
	Gibt es weitere betroffene Tiere in der Umgebung?	
	Vorbehandlungen:	
	- Welche:	
	- Erfolg der Vorbehandlungen:	
	- Weiterer Verlauf seit Vorbehandlungen:	
	Andere Erkrankungen:	
	Haltung des Pferdes:	
	Nutzung des Pferdes:	
<b>Vorkommen</b>		
	Solitär:	
	Multipel:	



**Abbildung 3.2:** Untersuchungsbogen Equine Sarkoide mit Skizze zum Einzeichnen der betroffenen Lokalisationen zur Unterstützung der Fotodokumentation. (Abbildung aus M.Sloet, 2001)

schluß zweischichtig. Nach dem fortlaufenden Vernähen der Unterhaut (Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt, 3,5 metric) wurde die Haut mit Einzelheften (Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt, 4,5 metric) oder Hautklammern (Weck Visistax<sup>®</sup>, Weck Closure Systems, N.C., USA) verschlossen. Alle Wunden erhielten eine Abdeckung mittels einer iodhaltigen Salbe (Braunovidon<sup>®</sup> Salbe, Braun, Melsungen). Wunden im Bereich des ventralen Abdomens wurden zum Schutz während der Aufstehphase des Pferdes mit einem selbstklebenden Klebeverband (Fixomull<sup>®</sup> Stretch, BSN Medical, Hamburg) abgedeckt. Es wurden stets alle Sarkoide der Pferde chirurgisch entfernt.

### 3.3.2 Postoperative Versorgung

Die Pferde erhielten in den ersten 7 Tagen postoperativ eine Analgesie (Phenylbutazon, 4,5 mg/kg Körpergewicht, oral) sowie eine Antibiose (Sulfadiazin und Trimethoprim, 30,0 mg/kg Körpergewicht, oral). Ab dem dritten Tag postoperativ wurden die Operationswunden einmal täglich mit einer iodhaltigen Waschlösung gereinigt und mit einer iodhaltigen Salbe abgedeckt. Diese Wundtoiletten erfolgten in der ersten Woche postoperativ zunächst täglich, im folgenden Verlauf alle zwei bis drei Tage. In regelmäßigen Abständen fand eine Beobachtung und Dokumentation des postoperativen Heilungsverlaufes der Wunden, sowie der Reaktionen auf die Vakzinierung statt.

### 3.3.3 Histopathologische Untersuchung

Die chirurgisch entfernten Tumore wurden histopathologisch im Veterinärmedizinischen Labor Dr. Weber, Bad Salzungen untersucht. Handelte es sich lediglich um kleine Sarkoide, so wurde das gesamte Tumorgewebe für die Vakzineherstellung genutzt (siehe Tabelle 4.1). Für den Versand zum histopathologischen Labor wurden die Tumore in Formalin (4%) konserviert. Die Auswertung der histopathologischen Untersuchungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Dabei wurden unter anderem folgende Färbemethoden zur Beurteilung der histologischen Schnitte der Tumoren eingesetzt:

**Hämatoxylin-Eosin-Färbung** ist die Standardfärbung, mit der sowohl Zellkerne als auch Zytoplasma dargestellt werden können. Die Zellkerne werden blauschwarz bis violett gefärbt, während das

Zytoplasma, Bindegewebs- und Muskelfasern hellrot erscheinen. Diese Färbung bietet einen Überblick über das Tumorpräparat und wird durch folgende Spezialfärbungen für die Darstellung von kollagenem Bindegewebe ergänzt.

**Azan-Färbung** ist eine typische Bindegewebsfärbung, die besonders für den Nachweis kollagener Fasern geeignet ist, die sich hier tiefblau darstellen. Dagegen leuchten Muskulatur und Zellkerne rot.

**Masson-Goldner-Färbung** ist ebenfalls eine Färbung, die für den Nachweis kollagenen Bindegewebes genutzt wird, welches hierbei dunkelgrün leuchtet. Hingegen sind Muskelzellen hellrot gefärbt. Die Zellkerne erscheinen bräunlich-schwarz und das umgebende Zytoplasma ziegelrot.

### 3.4 Methode der Vakzine-Herstellung

Die Herstellung der Vakzine wurde für jeden Patienten jeweils zwei Mal nach einheitlichem Schema durchgeführt. Sie beinhaltete, wie in den nachfolgenden Abschnitten detailliert dargestellt, die Blutentnahme, Zellisolierung und Zellkultivierung, die Tumoraufbereitung sowie die anschließende Injektion der Vakzine. Die isolierten equinen monozytären Zellen wurden in Anlehnung an in der Literatur beschriebenen human- und veterinärmedizinischen Studien (siehe 2.10.3), mit humanem GM-CSF und equinem IL-4 kultiviert, um eine Differenzierung zu DC zu erzielen (Porcelli et al., 1992; Steinman, 1991; Steinbach et al., 1995; Peters et al., 1996; Banchereau und Steinman, 1998; Hammond et al., 1999; Rice et al., 2004), (Peters und Kollegen, persönliche Mitteilungen; Steinbach und Mauel, persönliche Mitteilungen).

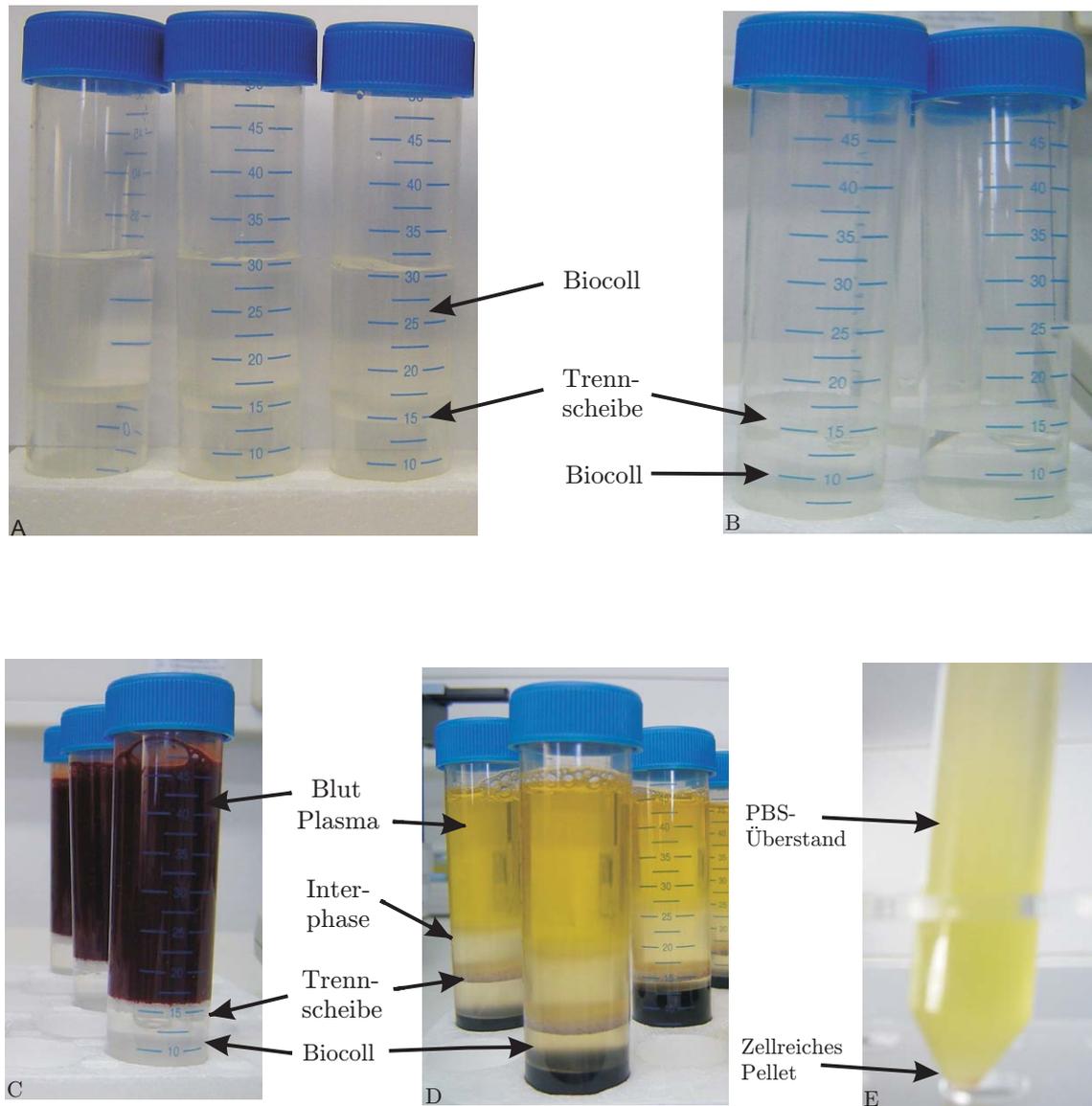
#### 3.4.1 Blutentnahme

Für jede Vakzineherstellung wurden dem Pferd steril 450 bis 500 ml Blut in einem Citratblutbeutel (Einfachblutbeutel, Baxter, München) sowie zur Serumgewinnung 50 ml Blut in einem Serumröhrchen (Citrucent<sup>®</sup>, Nerbe Plus, Winsen / Luhe) entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus einer der Jugularvenen, nach vorheriger Desinfektion (Cutasept<sup>®</sup>G, Hautdesinfizienz, Bode Chemie, Hamburg) der Einstichstelle. Nach Ge-

winn der ausreichenden Menge Blut wurde die Einstichstelle mit einer iodhaltigen Salbe (Braunovidon<sup>®</sup> Salbe) abgedeckt.

### 3.4.2 Zellisolierung, Kultivierung

Von dem steril in einem Citratblutbeutel gewonnenem 450 bis 500 ml Vollblut, wurden je 25 bis 35 ml Blut auf Trennscheiben in sterilen 50 ml Leukosep-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen), unter denen sich 15 ml isotonische Biocoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin) befand, aufgeschichtet und anschließend 20 Minuten bei 2500 rpm ohne Bremse zentrifugiert (Rotina Zentrifuge, Hettich, Bäch / Schweiz) (siehe Abbildung 3.3). Durch einen Dichtegradienten kommt es dabei zur Auftrennung der mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) von den Erythrozyten und den meisten polymorphkernigen Leukozyten. Erythrozyten und Leukozyten sammeln sich aufgrund ihrer größeren Dichte im unteren Bereich des Röhrchens als Pellet an (siehe Abbildung 3.3). Anschließend wurde der Überstand bis zur sichtbaren weißen Schicht mit mononukleären Zellen abgesaugt. Es wurden die Überstände aus zwei Röhrchen gemeinsam in ein neues, gekühltes 50 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Jedes Röhrchen wurde mit gekühltem PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 1700 rpm, woraufhin sich der zellreiche Anteil in einem am Boden des Röhrchen befindlichen Pellet versammelte. Dieses Pellet konnte nach Abnehmen des Überstandes, mittels gekühltem PBS resuspendiert werden. Es folgten zwei bis drei Waschschriffe nach gleichem Schema, bis der Überstand nach der Zentrifugation sichtbar frei von Thrombozyten war. Anschließend wurde aus dem resuspendierten Pellet die Zellzahl bestimmt (Neubauer Zählkammer). Nachfolgend wurde die Zellsuspension mit Zusatz von RPMI und 5% autologem Serum in einer Zellkulturschale (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heracell, Heraeus, Hanau) zur Adhärenz gebracht. Nach zwei Stunden wurden nicht an der Schale anhaftende Zellen mit PBS vorsichtig abgespült. Unter Zugabe von RPMI, 1,5% autologem Serum, 300 U/ml equinem Interleukin-4 (David W. Horohov, Department of Comparative Biomedical Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Lexington, USA) und 30 U/ml humanem GM-CSF (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) wurden die adhärennten Zellen für die Dauer von sechs Tagen, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.



**Abbildung 3.3:** Isolierung der peripheren Blutmonozyten: **A)** 15 ml Biocoll ist auf der Trennscheibe in Leukosepröhrchen aufgeschichtet, **B)** 15 ml Biocoll wurden durch Zentrifugation (2 Minuten, 1500 rpm) unter die Trennscheibe in Leukosepröhrchen gebracht, **C)** 25 ml Blut aufgeschichtet in Leukosepröhrchen, **D)** Erfolgte Separierung des Blutes nach erster Zentrifugation (20 Minuten, 2500 rpm, ohne Bremse), Die Interphase ist oberhalb der Trennscheibe erkennbar, **E)** PBS-Überstand nach weiterer Zentrifugation (10 Minuten, 1700 rpm) und zellreiches Pellet am Boden des Röhrchens.

### 3.4.3 Tumoraufbereitung

Das Tumorgewebe wurde nach chirurgischer Entfernung ohne Zugabe eines Mediums sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Vakzineherstellung wurde der Tumor zunächst manuell gereinigt. Dazu wurden vorhandene Haare entfernt und die Oberfläche mittels PBS abgespült. Nachfolgend erfolgte mit einem Skalpell das Schneiden eines maximal kirschgroßen Tumorstückes in feine Scheiben sowie die anschließende Abfüllung in ein steriles Röhrchen, welches dann für zwei Minuten in flüssigen Stickstoff gebracht wurde. In einer Gewebemühle (MM 301, Firma Retsch, Haan) wurde der gefrorene Tumor zu einem Pulver gemahlen (3 Minuten, 3000 rpm). Zu dem Tumorpulver wurden 1,0 - 2,0 ml Wasserstoffperoxid (30%, Sigma Chemie, München) gegeben. Um diese schäumende Reaktion zu stoppen, wurden 20 ml Ethanol (70%, Neolab, Heidelberg) zugesetzt. Die Suspension wurde durch einen Filter (Porengröße  $100\ \mu\text{m}$ ) gegeben. Das im Filter aufgefangene Material wurde zentrifugiert (10 Minuten, 2500 rpm, Rotina Zentrifuge), wodurch das enthaltene Ethanol daraufhin mit sterilem PBS heraus gespült werden konnte. Es folgten zwei weitere Schritte der Zentrifugation mit gleichen Einstellungen und dem anschließenden Spülen mit sterilem PBS. Zuletzt wurde dem Tumormaterial eine Mischung verschiedener Antibiotika ( $50,0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin,  $100,0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Metronidazol,  $2,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Amphotericin B,  $100,0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin) zugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  über 24 Stunden. Am folgenden Tag erfolgten mehrere Waschschrte mit sterilem PBS, um die Antibiotika heraus zu waschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der PBS-Überstand abgenommen und das gewonnene Tumormaterial in einem Eppendorfgesäß bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am dritten Tag wurden drei bis vier Auftau- und Einfrierzyklen durchgeführt um das Tumorgewebe letztlich wieder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für mindestens weitere zwei Tage zu lagern.

### 3.4.4 Fertigstellung der Vakzine

Am sechsten Tag erfolgte nach visueller Beurteilung der kultivierten Zellen die Zugabe einer Spatelspitze (circa ein Gramm) des Tumorgewebes in die Zellkulturschalen, welches zuvor mit 1,0 ml sterilem PBS resuspendiert wurde. Im Anschluss inkubierten die Zellen 24 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Am siebenten Tag wurde erneut eine visuelle Betrachtung der Zellen durchgeführt, welche von unregelmäßiger Gestalt waren und

Zytoplasmafortsätze aufwiesen, womit sie dem mikroskopisch erkennbaren Bild vom Vortag entsprachen. Es lagen lediglich einige abgelöste (nicht-adhärenente) Zellen in der Zellkultur vor. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit dem Abgießen des Zellkulturmediums entfernt. Die am Boden der Zellkulturschale haftenden adhärenenten Zellen konnten mit 25 ml kaltem PBS von der Zellkulturschale gelöst, anschließend abpipettiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt werden, woraus mit einer Spritze die Zellsuspension injektionsfähig entnommen wurde.

### 3.4.5 Vakzinierung

Die Vakzinierung wurde in der zweiten Woche (eine Woche postoperativ) und in der sechsten Woche vorgenommen. Dazu wurden die Pferde mittels intravenöser Injektion von Xylazin (1,1 mg/kg Körpergewicht) sediert. Es erfolgten intrakutane Injektionen der Vakzine, jeweils direkt an die zuvor gereinigten und desinfizierten Bereiche der Wundränder aller chirurgisch entfernten Sarkoide. Hierbei wurde darauf geachtet, dass an jeder Lokalisation, an der ein equines Sarkoid chirurgisch entfernt wurde, eine Injektion durchgeführt wurde. Je nach Anzahl und Größe der Wundfläche wurden zwischen 0,2 ml und 0,4 ml Vakzine pro Applikationsort injiziert.

## 3.5 Geräte und Substanzen

Handelsname	Hersteller
Kugelmühle MM 301	Retsch, Haan
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Köln
Ethanol, 70%	Neolab, Heidelberg
PBS (Phosphat Buffered Saline, pH 7,4)	Sigma-Chemie, München
Pipetten, Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Wasserstoffperoxid, 30%	Sigma-Chemie, München
Zellsiebe	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg

**Tabelle 3.2:** Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Tumoraufarbeitung

Handelsname	Hersteller
Heracell Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Rotina Zentrifuge	Hettich, Bäch, Schweiz
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Amphotericin	Sigma-Chemie, München
Ampicillin	Sigma-Chemie, München
Biocoll (1,077g/ml)	Biochrom, Berlin
Einfachblutbeutel	Baxter, München-Unterschleißheim
Equines Interleukin-4	David W. Horohov, Departm. of Comparative Biomed. Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Lexington, USA
Gentamicin	Sigma-Chemie, München
Humanes GM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Leukosep Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Metronidazol	Sigma-Chemie, München
PBS	Sigma-Chemie, München
Pipetten und -spitzen	Eppendorf, Köln
Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
RPMI Zellkulturmedium	Sigma-Chemie, München
Trypanblau	Sigma-Chemie, München
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen

**Tabelle 3.3:** Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultivierung

Handelsname	Hersteller
Blutanalysegerät Vet abc	Scill, Viernheim
Braunoderm <sup>®</sup> , Salbe	Braun, Melsungen
Braunüle MT <sup>®</sup> Luer Lock 2G14	Braun, Melsungen
Cutasept <sup>®</sup> G Hautdesinfizienz	Bode Chemie, Hamburg
Diazepam Ratiopharm 10 <sup>®</sup>	Ratiopharm, Ulm
Elektrotom 541	Berchthold, Tuttlingen
Equipalazone <sup>®</sup>	Intervet, Unterschleißheim
Fixomull <sup>®</sup> Stretch	BSN Medical, Hamburg
Inhalationsnarkosegerät	Eickemeyer, Tuttlingen
Isoflo <sup>®</sup>	Abbott Animal Health, Illinois, USA
Isotonische Kochsalzlösung <sup>®</sup>	Serumwerk, Bernburg
Phenylbutazon 20% <sup>®</sup>	Medistar, Holzwickede
Sedivet <sup>®</sup>	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Trimeto TAD <sup>®</sup>	aniMedica, Senden-Bösensell
Ursotamin <sup>®</sup>	Serumwerk, Bernburg
Vicryl <sup>®</sup> , 3,5 metric	Ethicon, Norderstedt
Wasa <sup>®</sup> Soft Hautwaschlotion	Lysoform, Berlin
Weck Visistax <sup>®</sup> Hautklammern	Weck Closure Systems, N.C., USA

**Tabelle 3.4:** Geräte, Medikamente und Verbrauchsmaterialien für die operative Tumorentfernung und die postoperative Nachsorge

# Kapitel 4

## Ergebnisse

Entsprechend der Zielsetzung der Arbeit wurde bei 21 Pferden, die von equinen Sarkoiden betroffen waren und bereits erfolglos vorbehandelt wurden, eine Kombinationstherapie angewendet, die aus der chirurgischen Entfernung aller Sarkoide sowie der Applikation einer auf autologen dendritischen Zellen basierenden Vakzine bestand. Die Darstellung der erzielten Ergebnisse ist in folgende zwei Teilbereiche gegliedert:

- Vakzine-Herstellung,
- Klinischer Verlauf der Behandlung.

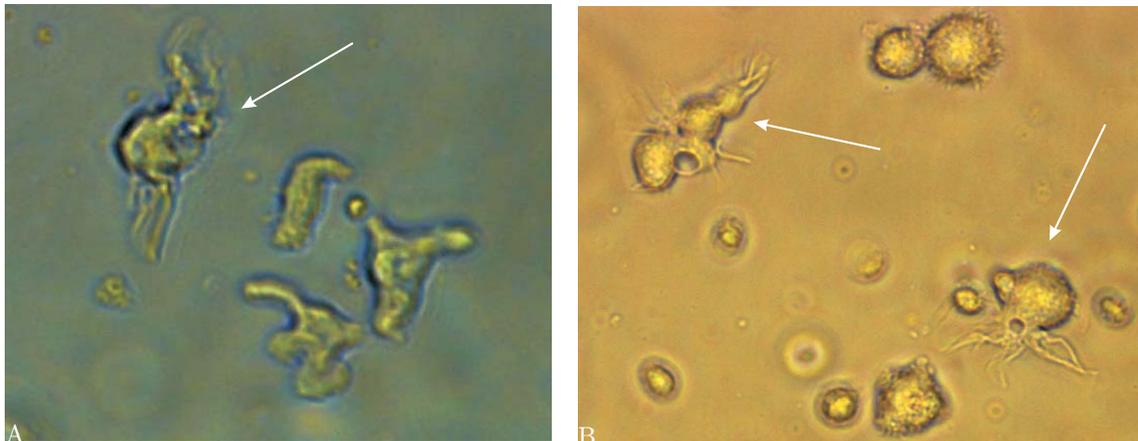
### 4.1 Ergebnisse der Vakzine-Herstellung

#### 4.1.1 Zellisolierung und Kultivierung

Aus 450 bis 500 ml venösem Blut von Pferden wurden Monozyten isoliert. Die Gesamtzahl der so isolierten Monozyten lag nach visueller Beurteilung und Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer bei durchschnittlich  $2,5 \times 10^6$  Monozyten / 500 ml Blut. In einer Zellkultur unter Zusatz von RPMI-Medium, autologem Serum, equinem Interleukin-4 und humanem GM-CSF zeigten die Monozyten nach 6 Tagen morphologisch stets das typische Erscheinungsbild von dendritischen Zellen (siehe Abbildung 4.1), was für alle durchgeführten Zellkultivierungen durch mikroskopische visuelle Kontrolle bestätigt werden konnte.

#### 4.1.2 Tumoraufbereitung und Vakzine-Fertigstellung

Bei allen Patienten wurden sämtliche Sarkoide chirurgisch entfernt, wobei immer auf die Vollständigkeit der Tumorentnahme geachtet wur-



**Abbildung 4.1:** 400-fache Vergrößerung der Zellen in der Zellkultur: Nach sechstägiger Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 entwickelten die aus dem peripheren Blut der Pferde isolierten Zellen die charakteristische lichtmikroskopische Morphologie dendritischen Zellen: baumartig-verzweigte Zytoplasmaausläufer (Pfeile).

de. Von jedem Pferd wurde ein im Durchmesser 2 cm großes Stück des Tumors für die Vakzineherstellung verwendet. Durch die Aufarbeitung konnten so jeweils etwa 5 Gramm homogenen Tumorpulvers gewonnen werden. Nach mikroskopischer Betrachtung der proliferierten Zellen am sechsten Tag der Kultivierung wurde etwa ein Gramm des Tumorpulvers mit sterilem PBS resuspendiert und in die Zellkulturschalen gegeben. Nach einer 24 stündigen Inkubation konnten am folgenden Tag die adhärennten Zellen durch Zugabe von kaltem PBS gelöst werden.

## 4.2 Klinische Untersuchung der Patienten

Signalement und Anamnese der Patienten, die im Rahmen der klinischen Voruntersuchung ermittelt wurden, sind in Tabelle 3.1 detailliert dargestellt. Die Gruppe der in dieser Studie behandelten Pferde bestand aus 10 Wallachen und 11 Stuten verschiedener Herkunft und Rasse. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Vorstellung im Alter von 3 und 17 Jahren. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt des Auftretens des ersten Sarkoids bei diesen Pferden betrug 5,7 Jahre, die jüngsten Tiere waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Erkrankung noch einjährig, das Älteste bereits dreizehn Jahre alt. Durchschnittlich traten 10,5 Sarkoide je Pferd auf. Die Patienten mit den wenigsten Sarkoiden besaßen zwei, das Tier mit den meisten besaß 89 Sarkoide (siehe Tabelle 4.2).

### 4.2.1 Klinisch-anatomische und histopathologische Beschreibung der Sarkoide

Neben einer allgemeinen klinischen Untersuchung erfolgte bei allen Patienten eine spezielle Untersuchung der Haut (siehe Abbildung 3.2 "Untersuchungsbogen Equine Sarkoide") einschließlich einer Fotodokumentation der equinen Sarkoide. Aufgrund der pathologisch-anatomischen Veränderungen wurde die klinische Verdachtsdiagnose equines Sarkoid gestellt. Es handelte sich um eine variable Anzahl an haarlosen, kugeligen bis flächigen derben, zum Teil verschiebbaren Umfangsvermehrungen im Bereich der Haut an verschiedenen Lokalisationen (siehe Tabelle 4.2). Diese waren zum Teil von intakter Haut umgeben. Andere, besonders im Bereich mechanischer Belastung - etwa in der Achsel, am Bauch oder in der Inguinalregion, wiesen oft eine oberflächliche Ulzeration auf.

Eine histopathologische Untersuchung konnte bei 5 Patienten nicht durchgeführt werden, da es sich lediglich um sehr kleine Sarkoide handelte, von denen das gesamte Tumorgewebe für die Vakzineherstellung genutzt wurde. Die Tumore dieser Patienten wurden lediglich klinisch beurteilt und als fibroblastische Sarkoide eingestuft. Die Auswertung der histopathologischen Untersuchungen der Sarkoide der weiteren 16 Pferde ist in folgender Tabelle 4.1 detailliert dargestellt. In allen untersuchten 16 Präparaten konnte die klinische Verdachtsdiagnose des equinen Sarkoids bestätigt werden.

8 der untersuchten Proben wurden als fibroblastisches Sarkoid und jeweils 4 als fibroblastisch-gemischtes und fibroblastisch-verruköses Sarkoid diagnostiziert. Als gemeinsame Eigenschaft aller untersuchten Biopsien ist die wirbel- bis strangförmige Anordnung der Fibroblasten ("hearingbone pattern") (siehe Abbildung 4.2, Bild B) festgestellt worden. In die Tiefe der Dermis ziehende Reteleisten der Epidermis ("picket fences") waren nur in 7 der 16 Proben nachzuweisen (siehe Abbildung 4.2, Bild D). Eine orthokeratotische Hyperkeratose war in 12 Präparaten vorhanden. In zwei Sarkoiden konnte in unmittelbarer Umgebung einer fokalen oder herdförmigen Erosion eine ebenso fokale oder herdförmige Ulzeration nachgewiesen werden. In 10 Fällen wurde lediglich eine Ulzeration diagnostiziert, die entweder geringgradig und fokal oder hochgradig und großflächig vorlag. 10 der 16 Präparate waren subepidermal durch neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, 3 der Präparate nur durch

Lymphozyten infiltriert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle 4.1 detailliert dargestellt. Zu beachten ist, dass bei multiplen Sarkoiden nicht alle, sondern nur einzelne Tumore histopathologisch untersucht wurden, so dass ein zusätzliches Vorhandensein weiterer Sarkoidtypen bei diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden kann.

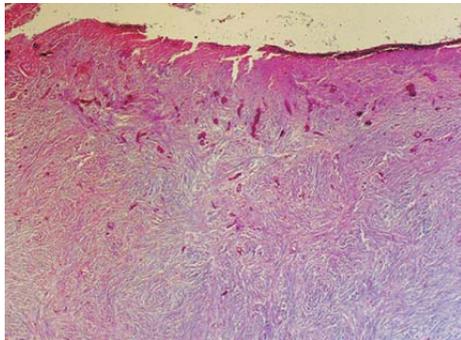


Abbildung a)

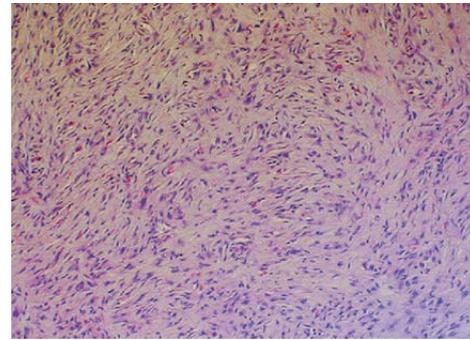


Abbildung b)

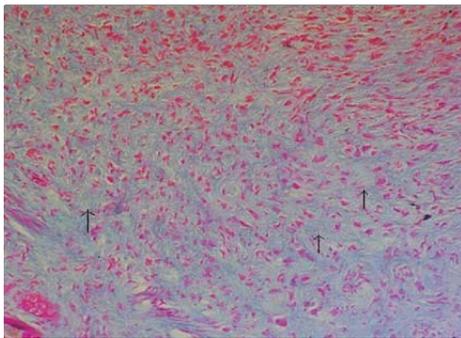


Abbildung c)

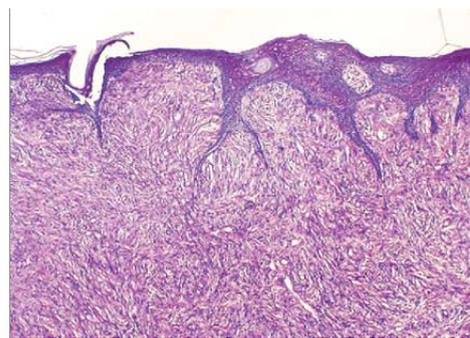


Abbildung d)

**Abbildung 4.2:** **A)** HE-Färbung: fibroblastischer Typ, wirbel- bis strangförmig angeordnete, gut differenzierte Fibroblasten, hochgradige oberflächliche Infiltration mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen, großflächige Ulzeration, 20-fache Vergrößerung. **B)** Ausschnitt aus Abbildung A), HE-Färbung: fibroblastischer Typ, wirbel- bis strangförmig angeordnete, ausgereifte Fibroblasten ("heringbone pattern"), geringgradige diffuse Infiltration mit eosinophilen Granulozyten und mononukleären Zellen, 40-fache Vergrößerung. **C)** Azan-Färbung: fibroblastischer Typ, wirbel- bis strangförmig angeordnete, gut differenzierte Fibroblasten, mittelgradige Ausbildung kollagenen Bindegewebes (Pfeile), 40-fache Vergrößerung. **D)** PAS-Reaktion: fibroblastisch-verruköser Typ, wirbel- bis strangförmige Anordnung der gut differenzierten Tumorzellen, gering- bis mittelgradige Ausbildung von Reteleisten, geringgradige fokale orthokeratotische Hyperkeratose, 20-fache Vergrößerung. Quelle der Fotos: Dr.M.Weber, Veterinärmedizinisches Labor Bad Salzungen

Histopathologische Tumorbeurteilung										
Patient	Sarkoid-Typ	Tumorzellmorphologie	Mitoserate	Reteleisten	Hyperkeratose	Erosion	Ulzeration	G / L		
1	nicht durchgeführt <sup>a</sup>									
2	nicht durchgeführt <sup>a</sup>									
3	nicht durchgeführt <sup>a</sup>									
4	fibroblastisch	heringbone pattern, relativ gut differenziert	+	-	-	-	großflächig	++ / +		
5	fibroblastisch	heringbone pattern, gut differenziert	(+)	-	+	-	-	++ / ++		
6	nicht durchgeführt <sup>a</sup>									
7	fibroblastisch	heringbone pattern, gut differenziert	+	+	+	-	fokal	+ / +		
8	fibroblastisch	heringbone pattern, gut differenziert	(+)	-	-	-	großflächig	++ / +		
9	fibroblastisch-verrukos	heringbone pattern, gut differenziert	(+)	-	+	-	großflächig	++ / ++		
10	fibroblastisch	heringbone pattern, relativ gut differenziert	(+)	-	+++ / ++++	-	-	- / -		
11	fibroblastisch-gemischt	heringbone pattern, relativ gut differenziert	+	+ / ++	+	fokal	fokal	++ / ++		
12	fibroblastisch-verrukos	heringbone pattern,	(+)	(+)	+	-	-	++ / ++		

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Patient	Sarkoid-Typ	Tumorzellmorphologie	Mitoserate	Reteleisten	Hyperkeratose	Erosion	Ulzeration	G / L
		gut differenziert						
13	fibroblastisch-gemischt	heringbone pattern, relativ gut differenziert	(+)	+ / +++	+	-	-	++ / +++
14	fibroblastisch-verrukos	heringbone pattern, gut differenziert	(+)	+++ / ++++	+	herdförmig	herdförmig	++ / +++
15	fibroblastisch	heringbone pattern, relativ gut differenziert	(+)	-	++	-	fokal	- / +
16	fibroblastisch-gemischt	heringbone pattern, gut differenziert	+	-	++	-	-	- / +
17	nicht durchgeführt <sup>a</sup> ,							
18	fibroblastisch-verrukos	heringbone pattern, mäßig gut differenziert	+	(+)	+	-	großflächig	- / +
19	fibroblastisch-gemischt	heringbone pattern, mäßig gut differenziert	+	++	-	-	großflächig	+++ / +
20	fibroblastisch	heringbone pattern, ausgereift	+	-	-	-	+++	++ / +++
21	fibroblastisch	heringbone pattern, mäßig gut differenziert	+	-	++	-	-	+ / +

**Tabelle 4.1:** Pathologisch-histologische Beurteilung, <sup>a</sup> = nur klinische Beurteilung, da zu wenig Tumormaterial vorhanden, - nicht vorhanden, (+) vereinzelt, + geringgradig, ++ mittelgradig, +++ hochgradig; G = neutrophile Granulozyten, L = Lymphozyten

### 4.2.2 Wundheilungsverlauf

Neben der im Abschnitt 4.2.3 beschriebenen durchgeführten Untersuchung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten der postoperative Heilungsverlauf der Wunden der Patienten beurteilt und dokumentiert (Beispiele sind am Ende dieses Abschnittes zu finden). Wie im Abschnitt 3.3.2 genannt, wurden ab dem dritten Tag postoperativ die Operationswunden einmal täglich gereinigt und mit einer iodhaltigen Salbe abgedeckt. Bei sieben Pferden traten im Beobachtungszeitraum von 5 Wochen post operationem Wundheilungsstörungen infolge sekundärer Wundheilung auf. Zum einen existierten bei zwei Pferden (7 und 20) aufgrund des großen Tumolvolumens sehr große Wundflächen, die eine starke Sekretion zeigten. Zum anderen befanden sich die entfernten Sarkoide bei vier Pferden (4, 7, 11 und 20) in mechanisch beanspruchten Gebieten der Achselregion. Diese Wunden zeigten neben einer starken Sekretion eine Krustenbildung und neigten zur Bildung einer Hypergranulation. Die Abheilung der großen Operationswunden bei den zwei genannten Patienten (7 und 20) dauerte über den Beobachtungszeitraum hinaus an. Bei Patient 6 war aufgrund der Lokalisation einiger Sarkoide eine Teilamputation des Euters notwendig. In diesem Bereich kam es zu geringgradigen Wundheilungsstörungen mit Auftreten von gesteigerter Sekretion und Krustenbildung. Der Verlauf von Heilung und Therapie ist in der Tabelle 4.2 dargestellt.

### 4.2.3 Nebenwirkungen

An den genannten Zeitpunkten wurden neben dem Heilungsverlauf auch die lokale und systemische Reaktion auf die Vakzinierung eingeschätzt. Zum Einen wurde das Auftreten von Zeichen einer lokalen Entzündung an der Lokalisation der Injektionen, in Form von Schwellungen, Rötungen, Schmerzhaftigkeit und vermehrter Wärme, eingeschätzt. Zum Anderen wurden systemische Nebenwirkungen, im Sinne allergischer Reaktionen kontrolliert. **Bei keiner der erfolgten Injektionen der Vakzine konnte eine lokale oder systemische Nebenwirkung beobachtet werden.** Dies betraf die sowohl die erste als auch die zweite Injektion bei allen Pferden. Bei Patient Nr. 18 wurde ein Jahr nach der Behandlung aufgrund aufgetretener Sarkoide eine zweimalige Wiederholungsimpfung nach gleichem Protokoll durchgeführt, die keinerlei feststellbare Nebenwirkungen zur Folge hatte.

#### 4.2.4 Therapieverlauf

Die Pferde wurden während des Aufenthaltes in der Tierklinik sowie nach der Entlassung in einem Beobachtungszeitraum von mindestens zwei Jahren bezüglich der Ausbildung von Rezidiven beurteilt (Beispiele sind am Ende dieses Abschnittes zu finden). Während des 6-wöchigen Aufenthaltes in der Tierklinik kam es bei keinem der Patienten zum erneuten Auftreten equiner Sarkoide.

Seit der Entlassung waren dreizehn Pferde bis Ende des Beobachtungszeitraumes sarkoidfrei und acht Pferde entwickelten Rezidive (3, 7, 8, 10, 16, 18, 19 und 20), wie im Folgenden detailliert dargestellt wird (siehe auch Tabelle 4.2). Bei 5 (3, 7, 8, 10 und 19) dieser Tiere kam es zur Ausbildung kleinerer Rezidive, zwei weitere Pferde (16 und 20) wiesen großflächige Rezidive auf. Ein Tier (18) entwickelte ein größeres Rezidiv, das nach dem gleichen Schema wiederholt behandelt wurde. Es ist seitdem frei von Rezidiven. Die Besitzer von fünf dieser Pferde mit Rezidiven (3, 8, 16, 19, und 20) lehnten eine Nachbehandlung ab. Pferd 10 wurde nach Abschluss der Therapie aus anderen, nicht mit dieser Studie im Zusammenhang stehenden Gründen euthanasiert.

Im Folgenden wird der Heilungsverlauf der fünf Pferde (3, 7, 8, 10 und 19), die Rezidive geringer Ausdehnung (bis ca. 5 cm Durchmesser) entwickelten, sowie der Heilungsverlauf der drei Pferde (16, 18 und 20) mit Rezidiven großer Ausdehnung (größer als 5 cm Durchmesser) geschildert. Eine Übersicht über den Heilungsverlauf bei allen Patienten ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

##### **Patienten mit Rezidiven geringerer Ausdehnung**

**Pferd 3:** wies vor Beginn der Behandlung vier teils ulzerierende, im Durchmesser 2 bis 3 cm große, Sarkoide an der Vorderbrust und im Inguinalbereich auf. Die Wundheilung verlief zufriedenstellend und ohne Komplikationen. 48 Monate post operationem entwickelte sich an teils gleichen Lokalisationen ein 4 cm großes Rezidiv im Inguinalbereich sowie ein 2 cm großes Sarkoid an der Vorderbrust, die seit dem Auftreten kein weiteres Wachstum zeigten. Eine wiederholte Behandlung des Pferdes wurde von den Besitzern abgelehnt.

**Pferd 7:** hatte vor der Behandlung 23 zum Teil ulzerierte Sarkoide in der Achsel und im Inguinalbereich. Das Sarkoid im Achselbereich, welches einen Durchmesser von 15 cm und ein Gewicht von 1400 g aufwies, stellte aufgrund der Größe und der Lokalisation die stärkste Beeinträchtigung des Tieres dar (siehe Abbildung 4.4). Besonders im Bereich der Achsel trat postoperativ eine mittelgradige Wundheilungsstörung, in Form von Hypergranulation und gesteigerter Sekretion auf, die auf die Reibung im Wundbereich zurückzuführen ist. Es kam im Folgenden zur zufriedenstellenden Heilung der Wunden. 6 Monate nach der Entlassung traten zwei 3 cm große Rezidive in der Achsel auf, die ohne eine Therapie innerhalb von zwei Monaten spontan regredierten.

**Pferd 8:** zeigte vor der Therapie drei Sarkoide, von denen sich zwei 3 cm große Sarkoide in der Gurtlage und ein, im Durchmesser 4 cm großes, Sarkoid medial am Knie befand. Die Wundheilung verlief ohne Komplikationen. Ein Jahr post operationem entwickelte sich medial am Knie ein 2 cm großes Rezidiv. Hierbei handelte es sich um die gleiche Lokalisation, wie bei dem ersten Auftreten. Da kein weiteres Wachstum des Rezidives beobachtet werden konnte, wurde von den Besitzern keine wiederholte Behandlung des Pferdes gewünscht.

**Pferd 10:** hatte vor der Behandlung vier 4-5 cm große Sarkoide in der Gurtlage. Die Wundheilung verlief komplikationslos. 4 Monate post operationem traten erneut in der Gurtlage 2, etwa 2 cm große Rezidive auf. Das Tier wurde nach Abschluss der Therapie aus anderen, nicht mit dieser Studie im Zusammenhang stehenden Gründen euthanasiert.

**Pferd 19:** wies vor der Therapie fünf Sarkoide am Präputium und im Inguinalbereich auf (siehe Abbildung 4.7). Die Wundheilung wurde als zufriedenstellend eingeschätzt. Ein halbes Jahr post operationem trat ein 2 cm großes Rezidiv im Innenschenkelbereich an gleicher Lokalisation wie bei dem ersten Auftreten auf. Da kein weiteres Wachstum stattfand, wurde eine erneute Behandlung des Tieres von den Besitzern abgelehnt.

**Patienten mit Rezidiven größerer Ausdehnung**

**Pferd 16:** wies vor der Behandlung 6 flächige, im Durchmesser 5-10 cm große Sarkoide an der seitlichen Brustwand auf. Die Wundheilung verlief ohne Komplikationen. 6 Monate post operationem kam es zur Ausbildung zweier ebenso flächiger Sarkoide an der seitlichen Brustwand, die etwa dem Zustand vor der Behandlung entsprachen. Eine Nachbehandlung des Pferdes wurde von den Besitzern nicht gewünscht.

**Pferd 18:** hatte vor der ersten Behandlung acht 5-7 cm große, großflächig ulzerierte Sarkoide in der Gurtlage und an der Innenseite der Ohrmuschel (siehe Abbildung 4.6). Es kam im Folgenden zu geringgradigen Wundheilungsstörungen in Form einer Hypergranulation. Ein Jahr post operationem trat an gleicher Stelle an der Ohrmuschel ein 5 cm großes Rezidiv auf, welches nach dem genannten Schema wiederholt behandelt wurde. Seitdem ist das Tier frei von Rezidiven.

**Pferd 20:** wies vor der Behandlung 35, zum Teil hochgradig ulzerierte, Sarkoide an dem Kopf, der Vorderbrust, der Achsel, im Inguinalbereich und am Innenschenkel auf. Im Heilungsverlauf traten mittelgradige Wundheilungsstörungen in Form von Hypergranulation, einhergehend mit gesteigerter Sekretion und Krustenbildung, auf. 6 Monate post operationem kam es zu einer massiven Rezidivierung an allen genannten Lokalisationen, die die Anzahl der ursprünglich behandelten Sarkoide überstieg. Eine wiederholte Behandlung des Tieres wurde von den Besitzern abgelehnt.

<b>Übersicht über den Therapie- und Heilungsverlauf</b>						
<b>Nr.</b>	<b>Zahl der Sarkoide</b>	<b>Lokalisation der Sarkoide</b>	<b>Wundheilung bis 5 Wochen post op</b>	<b>Rezidive nach Entlassung</b>	<b>Beobachtungszeitraum (Monate)</b>	<b>Nachbehandlung</b>
1	4	Präputium	o.b.B.	keine	71	keine
2	2	Kopf	o.b.B.	keine	60	keine
3	4	Vorderbrust, Inguinalbereich	o.b.B.	2 kleine Rezidive an der Vorderbrust, 2 Jahre post op	60	nicht erwünscht
4	2	Achsel	geringgradige Wundheilungs- störung	keine	60	keine
5	89	Kopf, Vorderbrust, Gurtlage, Achsel, Inguinalbereich	geringgradige Wundheilungs- störung	keine	49	keine
6	10	Ohr, Euter, Innenschenkel	geringgradige Wundheilungs- störung	keine	39	keine
7	23	Achsel, Inguinalbereich	mittelgradige Wundheilungs- störung	2 kleine Sarkoide in der Achsel, 4 Monate post op	37	nicht notwendig, da Rückbildung
8	3	Gurtlage, medial an Knie	o.b.B.	1 kleines Sarkoid medial am Knie, 1 Jahr post op	38	nicht erwünscht
9	5	Gurtlage, Euter	o.b.B.	keine	36	keine
10	4	Gurtlage,	o.b.B.	2 kleine Sarkoide in der Gurtlage, 4 Monate post op	28	Pferd wurde euthanasiert
11	6	Gurtlage, Achsel	geringgradige Wundheilungs- störung	keine	40	keine
Fortsetzung auf der folgenden Seite						

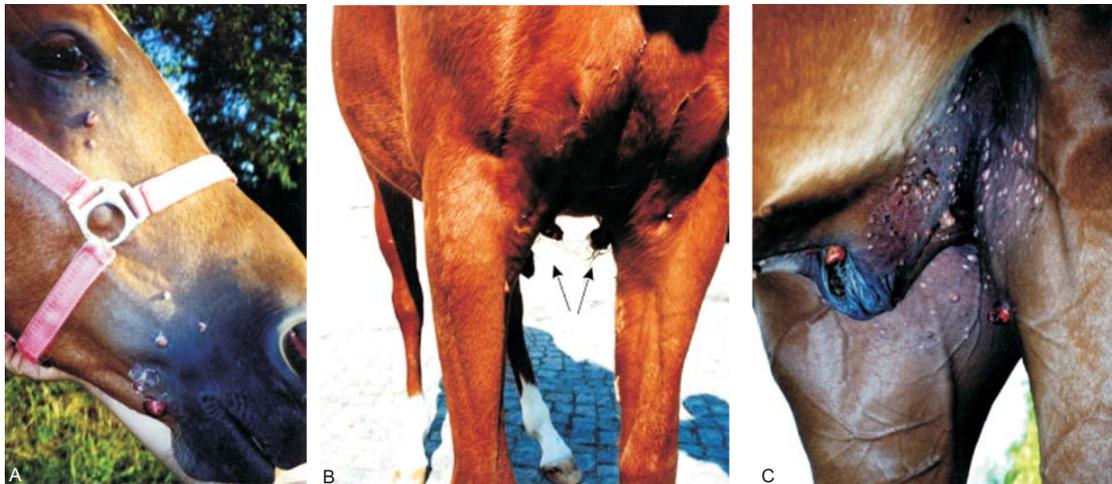
Nr.	Zahl der Sarkoide	Lokalisation der Sarkoide	Wundheilung bis 5 Wochen post op	Rezidive nach Entlassung	Beobachtungszeitraum (Monate)	Nachbehandlung
12	52	Vorderbrust, Gurtlage, Präputium	o.b.B.	keine	36	keine
13	6	Vorderbrust, Gurtlage	o.b.B.	keine	38	keine
14	6	Vorderbrust, Gurtlage	o.b.B.	keine	30	keine
15	10	Ohr, Vorderbrust, Gurtlage, Euter	o.b.B.	keine	26	keine
16	6	seitliche Brustwand	o.b.B.	2 flächige Sarkoide an seitlicher Brustwand, 6 Monate post op	28	nicht erwünscht
17	5	Euter	o.b.B.	keine	60	keine
18	8	Ohr, Gurtlage	geringgradige Wundheilungs- störung	1 Sarkoid am Ohr, 12 Monate post op	36	Wiederholungs- impfung, seit- dem sarkoidfrei
19	5	Präputium, Inguinalbereich	o.b.B.	1 kleines Sarkoid am Innenschenkel, 6 Monate post op	28	nicht erwünscht
20	35	Kopf, Achsel Vorderbrust, Inguinalbereich, Innenschenkel,	mittelgradige Wundheilungs- störung	massive Rezidi- vierung, an allen Lokalisationen, 6 Monate post op	60	nicht erwünscht
21	6	Vorderbrust, distale Gliedmaße	o.b.B.	keine	25	keine

**Tabelle 4.2:** Überblick über den Therapie- und Heilungsverlauf während des Beobachtungszeitraumes bis Juni 2006. Die hier genannte Anzahl equiner Sarkoide entspricht bei allen Pferden auch der Anzahl der chirurgisch entfernten Sarkoide, als Zeitraum ist der Beobachtungszeitraum zu verstehen (jeweils die Zeit seit der Entlassung aus der Tierklinik bis Juni 2006, bzw. bis zum Datum der Euthanasie), Nr. - Patient, o.b.B. - ohne besonderen Befund, post op - post operationem.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei 13 der 21 behandelten Pferde im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nach der Behandlung keine Rezidive aufgetreten sind. Fünf Pferde (Pferde 3, 7, 8, 10 und 19) entwickelten nach der Behandlung Rezidive in Form von kleinen, weniger als 5 cm großen Sarkoiden. Bei Pferd 7 bildeten sich die 2 neu aufgetretenen Sarkoide ohne Behandlung zurück. Bei den Pferden 3, 8 und 19 traten nach der Behandlung jeweils ein kleines Rezidiv, welche auf Wunsch der Besitzer nicht erneut behandelt werden sollten. Pferd 10 zeigte nach der Behandlung 2 Rezidive, wurde jedoch nach Abschluss der Behandlung aus anderen, nicht mit dieser Studie im Zusammenhang stehenden Gründen euthanasiert. 3 Pferde (Pferde 16, 18 und 20) entwickelten Rezidive, die in ihrem Ausmaß größer als 5 cm waren. Pferd 16 entwickelte nach der Therapie 2 Rezidive mit flächiger Ausbreitung, die auf Wunsch der Besitzer jedoch nicht behandelt werden sollten. Bei dem Pferd 18 trat nach der Therapie an einer Stelle ein Rezidiv auf, welches wiederholt nach dem gleichen Schema chirurgisch entfernt und durch zweimalige Vakzinierung behandelt wurde. Seitdem ist dieses Pferd sarkoidfrei. Das Pferd 20 zeigte keine Verbesserung der Situation, denn nach der Behandlung trat eine massive Rezidivierung auf. Das Pferd sollte jedoch, auf Wunsch der Besitzer, nicht erneut behandelt werden.

### 4.3 Beispiele der behandelten Patienten

In diesem Abschnitt wird ein Teil der Fotodokumentation dieser Studie präsentiert. Die wichtigsten Informationen der exemplarisch dargestellten Fälle sind den jeweiligen Bildunterschriften zu entnehmen.



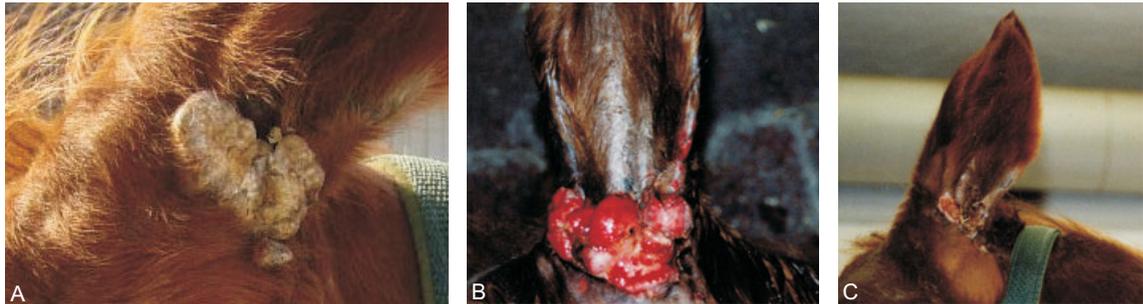
**Abbildung 4.3:** Patient Nr. 5 wies vor der Behandlung 89 Sarkoide im Bereich des Kopfes, der Achsel, der Gurtlage und des Inguinalbereiches auf. **A)** fibroblastische Sarkoide im Kopfbereich, **B)** fibroblastische Sarkoide (Pfeile) in der Achsel und der Gurtlage, **C)** fibroblastische Sarkoide im Inguinalbereich. Postoperativ traten geringgradige Wundheilungsstörungen auf, die infolge einer intensiven Wundpflege vollständig abheilten. Das Pferd ist seit der Behandlung frei von Sarkoiden.



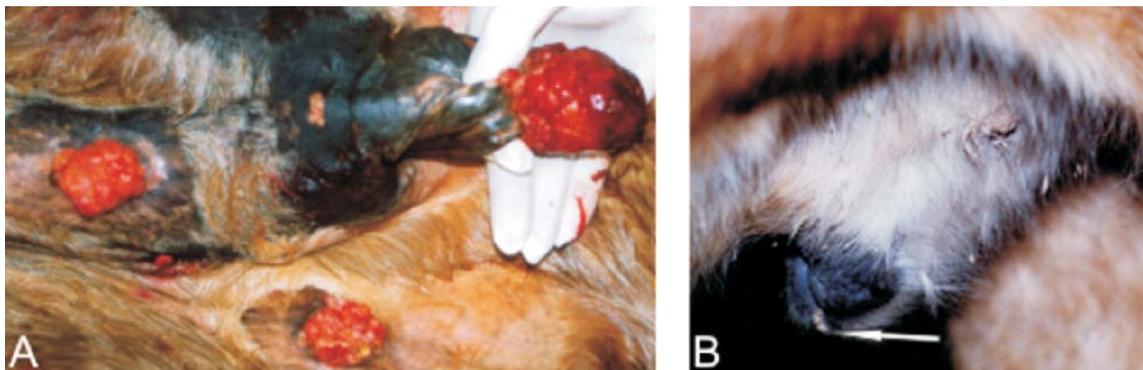
**Abbildung 4.4:** Patient Nr. 7 wies vor der Behandlung 23 Sarkoide in der Achsel und im Inguinalbereich auf. **A)** fibroblastische Sarkoide im Achselbereich von vorn, **B)** Fibroplastisches Sarkoid an der Vorderbrust intraoperativ, das Nahtmaterial von vorhergehenden Abbinde - Versuchen ist noch sichtbar (Pfeile), **C)** Zustand intraoperativ nach Entfernung des 1400g schweren Tumors. Postoperativ entwickelte das Tier besonders im Bereich der Achsel mittelgradige Wundheilungsstörungen. 6 Monate nach der Entlassung traten 2 kleine Rezidive in der Achsel auf, die spontan regredierten.



**Abbildung 4.5:** Patient Nr. 14 wies vor der Behandlung 6 Sarkoide an der Vorderbrust und der Gurtlage auf. **A)** Stehendes Pferd, zum Zeitpunkt der Vorstellung: fibroblastisch-verrucöses Sarkoid an der Gurtlage, **B)** Zustand des gleichen Sarkoides mit Krusten und starker Verschmutzung, präoperativ **C)** Zustand des gleichen Sarkoids intraoperativ. Postoperativ verlief die Wundheilung aller Operationswunden ohne Komplikationen. Das Tier ist seit der Behandlung frei von Sarkoiden.



**Abbildung 4.6:** Patient Nr. 18 wies vor der Behandlung 8 Sarkoide am Ohr und in der Gurtlage auf. **A)** Fibroblastisch-verruköses Sarkoid am Ohr bei der Erstvorstellung, postoperativ wies das Tier geringgradige Wundheilungsstörungen auf. **B)** Fibroblastisch-verruköses Sarkoid am Ohr 12 Monate nach der Operation. **C)** Zustand 5 Wochen nach erfolgter Operation des Rezidives, zum Zeitpunkt der 2. Wiederholungsimpfung. Anschließend zeigte sich das Pferd sarkoidfrei.



**Abbildung 4.7:** Patient Nr. 19. **A)** Der Patient wies vor der Behandlung 5 Sarkoide am Penis, am Präputium und im Inguinalbereich auf. **B)** Das Pferd entwickelte etwa 6 Monate nach der Operation ein kleines Rezidiv am Penis (Pfeil). Eine Nachbehandlung wurde von den Besitzern nicht erwünscht.



# Kapitel 5

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Therapie equiner Sarkoide bei Pferden unter Verwendung autologer dendritischer Zellen im Sinne einer exploratorischen Studie durchgeführt. Es sollte die Sicherheit und Wirksamkeit einer solchen Behandlung bei equinen Sarkoiden untersucht und insbesondere gezeigt werden, ob es zu außergewöhnlichen Reaktionen im Sinne von Nebenwirkungen oder zu einer Verschlechterung des klinischen Verlaufs kommt.

Die Bedeutung einer wirksamen Therapie equiner Sarkoide ist darin zu sehen, dass diese Tumorart nicht nur ein kosmetisches Problem darstellt, sondern eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere auftreten kann und eine Nutzungseinschränkung des betroffenen Pferdes aufgrund der Tumorlokalisierung und Tumorausdehnung möglich ist. Equine Sarkoide zählen zu den häufigsten Tumoren bei Pferden und werden als semimaligne, lokal invasive Tumore eingestuft (Lepage et al., 1998). Bereits 1936 erkannte Jackson die Notwendigkeit der Differenzierung von anderen Tumorarten und prägte den Begriff **Equines Sarkoid** (Jackson, 1936). Heute gilt sowohl eine infektiöse Genese durch bovine Papillomviren (BPV), als auch die Notwendigkeit des Vorhandenseins notwendiger Kofaktoren, als gesichert (Amtmann et al., 1980; Trennfeld et al., 1985; Chambers et al., 2003; Johnes et al., 2004). Von der Vielzahl der existierenden Behandlungsmethoden ist keine als universell einsetzbar anzusehen. Equine Sarkoide neigen zur Rezidivierung und zeigen kaum spontane Regressionen.

Auf der Basis der Erkenntnisse der Tumorthherapie beim Menschen mittels dendritischen Zellen (DC) (Mackensen et al., 2000; Gitlitz et al., 2003; Goldszmid et al., 2003; Yamanaka et al., 2005) wurde in dieser

Arbeit eine autologe Vakzine zur Therapie von equinen Sarkoiden untersucht. Aus dem peripheren Blut von mit equinen Sarkoiden betroffenen Pferden wurden dafür Monozyten isoliert und unter Zusatz der Zytokine IL-4 und GM-CSF dendritische Zellen hergestellt. Unter Zugabe autologen Tumorantigens konnte eine Vakzine angefertigt werden, die anschließend dem jeweiligen Pferd injiziert wurde.

In diesem Kapitel wird zunächst kurz auf die Ergebnisse der Charakterisierung der Patienten und der Vakzineherstellung eingegangen. Anschließend folgen Betrachtungen zum Ergebnis der Studie - zur Sicherheit und Wirksamkeit der applizierten Vakzine. Des Weiteren erfolgt eine Bewertung des klinischen Verlaufs der Therapie. Am Ende werden einige Schlussbemerkungen zu möglichen kombinierten Verfahren zur Behandlung equiner Sarkoide sowie zu dem Anwendungspotential der im Rahmen der Studie untersuchten DC-basierten Tumorthherapie gegeben.

Für die Durchführung dieser Studie standen 21 an equinen Sarkoiden erkrankte Pferde zur Verfügung, welche in der Tierklinik des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb GmbH) in Bad Langensalza vorgestellt wurden. Die unterschiedliche Art der Vorbehandlung, der unterschiedliche Zeitraum seit dem Auftreten der equinen Sarkoide bis zur Vorstellung in der Tierklinik sowie die inhomogene Anzahl und Lokalisation der Sarkoide ist in der Bewertung der Vergleichbarkeit dieser Studie zu beachten und aufgrund der geringen Anzahl der Tiere als nicht repräsentativ für die Gesamtheit der Pferdepopulation anzusehen. Aus diesen Gründen wird auf eine statistische Analyse verzichtet.

Bei den in dieser Studie behandelten von equinen Sarkoiden betroffenen Pferden handelte es sich ausschließlich um sonst klinisch gesunde und bereits vom jeweiligen Haustierarzt vorbehandelte Tiere (siehe Tabelle 3.1). Allerdings stellten nur die wenigsten Vorbehandlungen adäquate oder anerkannte Therapieformen dar. Die Vorbehandlungen erfolgten sehr verschieden und bewirkten weder eine Rückbildung der vorhandenen Tumore, noch verhinderten sie die Entstehung neuer Sarkoide. Der Zeitpunkt des Auftretens erster Sarkoide bei den Pferden schwankte zwischen einem und 13 Lebensjahren. Im Durchschnitt wur-

den die Sarkoide in einem Alter von 5,7 Jahren erstmals diagnostiziert, was den Angaben von Strafuss et al. entspricht (Strafuss et al., 1973). Ein Patient (Pferd 5) war zur Zeit der Erstdiagnose ein Jahr alt. Über einen solch frühen Zeitpunkt der ersten Feststellung equiner Sarkoide berichteten auch Marti und Kollegen in ihrer Studie (Marti et al., 1993). Der Zeitraum seit dem ersten Auftreten der Sarkoide bis zur Vorstellung variierte zwischen einem halben Jahr und drei Jahren und lag durchschnittlich bei etwa 16 Monaten. Das multiple Auftreten und die Lokalisation der equinen Sarkoide vor allem im Inguinalbereich, entspricht den Angaben der Literatur (Marti et al., 1993; Torrontegui und Reid, 1994). So schwankte die Zahl der Sarkoide pro Pferd in der untersuchten Gruppe zwischen 2 und 89 Sarkoiden, die insbesondere im Inguinalbereich, an der Gurtlage und an der Vorderbrust vorkamen. Weitere häufig betroffene Lokalisationen waren der Kopf und die Achsel. Entgegen einiger Angaben in der Literatur, in denen eine Häufung equiner Sarkoide bei männlichen Tieren sowie bei Quarter Horses genannt wird (Angelos et al., 1988; Mohammed et al., 1992), kamen in dieser Studie Wallache und Stuten verschiedener Rasse und Farbe vor.

Die Diagnose zum Vorliegen equiner Sarkoide wurde durch eine histopathologische Untersuchung der Tumore im veterinärmedizinischen Labor Dr. Weber, Bad Salzungen, bei 16 Pferden durchgeführt und bestätigt. Bei einigen Patienten (Pferde 1, 2, 3, 6 und 17) lag jedoch sehr wenig Tumormaterial vor, so dass sich in diesen Fällen auf eine rein klinische Diagnosestellung gestützt wurde. Da nicht die vollständigen Tumoren zur histopathologischen Diagnostik verwendet wurden, konnte die Beurteilung über eine vollständige Entfernung des Tumormaterials nicht erfolgen. Dies ist bei multiplen Tumoren auch unter wirtschaftlichen Aspekten nicht praktikabel, wäre jedoch für eine wissenschaftliche Auswertung sehr sinnvoll. Bei der chirurgischen Exzision der Sarkoide wurde jedoch stets angestrebt, den Tumor vollständig zu entfernen. 8 der untersuchten Proben wurden als fibroblastisches Sarkoid und jeweils 4 als fibroblastisch-gemischtes und fibroblastisch-verruköses Sarkoid diagnostiziert. Weitere Sarkoidtypen, wie das okkulte Sarkoid, die noduläre Form, der reine verruköse Typ oder die malevolente Ausprägung kamen bei dem untersuchten Tumormaterial nicht vor.

Hierzu ist jedoch zu bedenken, dass nicht alle der multiplen Tumore der Patienten histopathologisch untersucht werden konnten, so dass

ein sicherer Ausschluss dieser Tumorformen nicht erfolgen kann. Als gemeinsames Merkmal des untersuchten Tumormaterials wurde die wirbelförmige Anordnung der massiv gebildeten Fibroblasten ("herringbone pattern") diagnostiziert, was die Angaben in der Literatur bestätigt (Tarwid et al., 1985). Weitere, in der Literatur beschriebene Charakteristika, wie tief in das Gewebe ziehende Reteleisten, auftretende Hyperkeratose bzw. das Vorkommen einer oberflächlicher Erosion oder einer Ulzeration konnte nicht in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Darin könnte ein Hinweis auf die Variabilität des Erscheinungsbildes sowie der Ausprägung equiner Sarkoide gesehen werden.

An dieser Stelle sei betont, dass mögliche Aussagen bezüglich der hier dargestellten Methode nicht auf alle Sarkoidtypen übertragbar sind, da es sich bei dem untersuchten Tumormaterial nachweislich nur um fibroblastische oder fibroblastisch-gemischte Typen handelte. Eine histopathologische Untersuchung sollte für nachfolgende Studien als wesentlicher Bestandteil der Diagnostik und Behandlung equiner Sarkoide nach Möglichkeit noch konsequenter realisiert werden, um beispielsweise eine genauere Prognose treffen zu können. Zusätzlich ist möglichst die histopathologische Analyse der Tumorränder einzubeziehen, um die Vollständigkeit der Tumorentfernung einzuschätzen. Mögliche Rückschlüsse auf die Ursachen von Rezidivierungen könnte auch eine PCR-Analyse der Tumorränder zum Nachweis vorhandener BPV-RNA geben.

Auf der Grundlage publizierter Studien aus der Humanmedizin wurden aus dem Blut der Patienten über Zentrifugation und Auftrennung mit Biocoll-Trennlösung periphere Blutmonozyten gewonnen (Porcelli et al., 1992; Steinman, 1991; Steinbach et al., 1995; Peters et al., 1996; Banchereau und Steinman, 1998; Hammond et al., 1999; Rice et al., 2004). Um eine Differenzierung zu dendritischen Zellen zu erreichen, wurden die isolierten monozytären Zellen mit humanem GM-CSF und equinem IL-4 stimuliert und über die Dauer von sechs Tagen bei 37°C kultiviert. Am 6. Tag erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der stimulierten Zellen. Visuell konnte bei allen untersuchten Zellkulturen das typische Erscheinungsbild dendritischer Zellen in Form adhärenter unregelmäßig geformter Zellen mit Fortsätzen diagnostiziert werden. Im Anschluss wurde das Tumormaterial hinzugefügt und die Zellkultur für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am 7. Tag erfolgte nach wieder-

holter mikroskopischer Betrachtung der Zellkultur die Ernte der zu DC differenzierten Zellen. Kritisch ist zu betrachten, dass es sich bei der Einschätzung der Zellkultur lediglich um eine rein visuelle mikroskopische Betrachtung und Zellzählung handelte. Weitere Verfahren zur Überprüfung der Zellreifung, beispielsweise dem Nachweis vorhandener Oberflächenantigene oder der Stimulationsfähigkeit gegenüber T-Lymphozyten, wurden im Rahmen dieser rein klinischen Arbeit nicht angewendet, sollten aber nach Möglichkeit in zukünftigen Studien berücksichtigt werden, um eindeutige Aussagen über die Wirksamkeit treffen zu können. Es war jedoch schon zu Beginn der Studie bekannt, dass humanes GM-CSF auf equine Zellen wirkt und sich auf diese Weise funktionelle DC herstellen lassen (Mauel, 2002). Für weitere therapeutische Ansätze sollte daher, wie dort dargelegt, autologes equines GM-CSF verwendet werden (Mauel, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Vakzineherstellung stets ein im Durchmesser maximal 2 cm großes Stück des Sarkoidmaterials jedes Patienten zerkleinert und aufgearbeitet. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei jeweils um eine heterogene Zellpopulation handelt. Die in der Literatur erwähnten möglichen Autoimmunreaktionen nach Applikation der Vakzine (Ludewig et al., 2000), konnten bei den untersuchten Patienten klinisch nicht beobachtet werden, selbst nicht im Falle einer wiederholten Applikation. Es wurden allerdings auch keine speziellen Laboruntersuchungen dazu durchgeführt. Zudem wurde die Vakzine keiner weitergehenden Qualitätsprüfung unterzogen. Dies sollte in weiteren Studien erfolgen.

Bei den 21 hier vorgestellten Patienten traten im direkten Zusammenhang mit der Applikation der Vakzine keine schweren lokalen oder systemischen Nebenwirkungen auf. Auch bei wiederholter Injektion konnten bei keinem der 21 Pferde Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Vakzinierung festgestellt werden. Selbst das Pferd 18, das aufgrund einer Rezidivierung nach 12 Monaten nach der Entlassung erneut eine Therapie nach gleichem Schema erhielt, zeigte keinerlei Nebenwirkungen. In der Literatur genannte Nebenwirkungen im Rahmen der Therapie equiner Sarkoide, treten insbesondere nach der wiederholten Injektion von BCG auf (Murphy et al., 1979). Es wurden zum Teil schwerwiegende systemische Nebenwirkungen, wie zum Beispiel allergische Reaktionen, nach der wiederholten BCG-Applikation beobachtet,

weshalb eine Prämedikation mit steroidalen und nichtsteroidalen Antiphlogistika empfohlen wird (Vanselow et al., 1988; Lavach et al., 1985). Die Verabreichung der genannten Medikamente inhibiert jedoch das Immunsystem und ist daher bei immunologischen Therapien, einschließlich der BCG-Vakzine, als kontraindiziert anzusehen. In der Literatur sind Nebenwirkungen einer auf dendritischen Zellen basierenden Vakzine selten beschrieben. In humanmedizinischen Phase-I-Studien, in denen Vakzine, bestehend aus Peptid-gepulsten DC, appliziert wurden, traten nur milde Nebenwirkungen in Form von leichtem Fieber, Müdigkeit, Lymphknotenschwellungen oder Erythemen an den Injektionsstellen auf (Mackensen et al., 2000; Liao et al., 2005). Nach den Beobachtungen an den 21 Pferden dieser Studie ist die hier angewendete Form der Vakzine als sicher anzusehen und mit keiner schweren Nebenwirkung verbunden.

Wie bereits genannt, verfügen Tumore über Escape-Mechanismen, um sich vor einer Immunantwort zu schützen (Kiertscher et al., 2000; Lipscomb und Masten, 2002), weshalb einige Autoren empfehlen, die vorhandene Tumorlast vor Beginn der Immuntherapie zu reduzieren (Danna et al., 2004; Qiu et al., 2006). Ein entsprechender Ansatz wurde auch in dieser Studie mittels chirurgischer Entfernung gewählt und scheint empfehlenswert. Aussagen über mögliche Reaktionen nach Injektion der Vakzine ohne vorherige Tumorexzision können somit allerdings nicht getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vakzine intrakutan, an allen Lokalisationen injiziert, an denen equine Sarkoide chirurgisch entfernt wurden, was eine Migration der DC in die regionären Lymphknoten zur Folge haben sollte. Diese Injektionsmethode ist allgemein von weniger Komplikationen begleitet, als die intravenöse Injektion, welche aus forensischen Gründen nur durchgeführt werden sollte, wenn keine einfachere Applikationsart angewendet werden kann (Eickmeier, 1981). Die intrakutane Injektion ist einfach durchzuführen und stellt auch für den Anwender, verglichen mit den erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen zum Beispiel bei einer Radiotherapie, keine besondere Gefahr dar. Da die Tiere post operativ an den Operationswunden oft eine erhöhte Sensibilität aufweisen, ist jedoch eine Sedierung des Patienten für die intrakutanen Injektionen zu empfehlen.

Entsprechend den Angaben in der Literatur, in denen eine beschleunigte und verstärkte Immunantwort, bedingt durch das immunologische Gedächtnis infolge wiederholter Applikation dendritischer Zellen beschrieben wird (Jungi, 2000; Lipscomb und Masten, 2002), erfolgte in dieser Studie eine zweimalige Vakzinierung. Ziel war es, auf diese Weise eine Verstärkung bzw. eine Verlängerung der Wirksamkeit gegen equine Sarkoide zu erreichen. In dieser Studie wurde ein zeitlicher Abstand von 4 Wochen zwischen den beiden Vakzinierungen gewählt, der bei allen Patienten eingehalten wurde. Beruhend auf allgemeinen Schemata zur Immunisierung, sollte somit eine maximal mögliche T-Zell-Aktivität erreicht werden. Allerdings konnte in einer Studie an Mäusen nachgewiesen werden, dass es Unterschiede in der durch den Einsatz von DC erreichten T-Zell-Aktivität gibt. Bei einer wöchentlichen subkutanen Applikation kam es nach 6 Wochen bereits zu einer Reduktion der anfänglich erhöhten T-Zell-Aktivität. Wurden die Vakzine alle 3 Wochen verabreicht, konnten sie diese Reduktion nicht beobachten (Serody et al., 2000). Man könnte daher in folgenden Studien auch untersuchen, ob ein kürzerer zeitlicher Abstand zwischen den Vakzinierungen zu einer höheren Wirksamkeit führt, ohne die Sicherheit der Methode zu beeinträchtigen.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine erste klinische Studie zum Nachweis von Sicherheit und Wirksamkeit der angewandten Therapie, die ausschließlich an erkrankten Patienten durchgeführt wurde. Daher liegt keine Kontrollgruppe vor, in der die Vakzine nur einmalig oder mehr als zwei Mal appliziert wurde. Es bleibt zukünftigen Studien vorbehalten, Untersuchungen bezüglich der T-Zell-Aktivität, speziell zum Vorhandensein zytotoxischer T-Zellen und tumorspezifischer CD4- und CD8-T-Zellen durchzuführen, wofür ein weiter gereinigtes, z.B. rekombinantes Antigen notwendig wäre. Damit wäre mittels molekularbiologischer Analyse des immunologischen Gedächtnisses eine genaue Beurteilung der Notwendigkeit einer wiederholten Injektion der Vakzine möglich.

Aus Angaben in der Literatur geht hervor, dass die Rezidivrate mit zunehmender Anzahl der Sarkoide steigt (Brandt et al., 1996) und zudem eine deutlich erhöhte Neigung zur erneuten Rezidivierung nach einem bereits erfolgten Therapieversuch besteht (Carstanjen

und Lepage, 1998; Knottenbelt, 2003). Entsprechend konnte für alle Patienten dieser Studie nur eine ungünstige Prognose gestellt werden, da entweder konservativ oder chirurgisch bereits eine oder mehrere Vorbehandlungen fehlschlugen. In dieser Studie wurden ausschließlich vorbehandelte Pferde einbezogen, deren Art der Vorbehandlung jedoch stark variierte. Daher ist zu beachten, dass die hier präsentierte Patientengruppe bezüglich der Beurteilung der Wirksamkeit der Vakzine keine ideale repräsentative Gruppe darstellt. Bei 15 Patienten handelte es sich ausschließlich um eine Vorbehandlung durch Abbinden. Bei vier Pferden wurde zusätzlich und bei zwei weiteren Pferden ausschließlich eine chirurgische Entfernung der Sarkoide durchgeführt. Neben der zum Teil fragwürdigen lokalen Applikation von salzhaltiger Zahncreme und Spinnengift, wurden außerdem homöopathische Medikamente sowie eine Vakzine, bestehend aus Tumorlysat angewendet. In allen Fällen folgte auf die Therapieversuche eine Ausbildung von Rezidiven. Somit stellen nur die sechs auch chirurgisch vorbehandelten Pferde einen plausiblen Therapieansatz dar.

Neben Rezidiven infolge einer chirurgischen Entfernung der Tumore können auch Komplikationen in der Wundheilung nach Knottenbelt häufig zu erneutem Tumorwachstum führen (Knottenbelt, 2003). Da von den Tierbesitzern zu der chirurgischen Vorbehandlung keine wissenschaftlich verwertbaren Angaben gemacht wurden, können mögliche Zusammenhänge mit der Rezidivierung in diesen Fällen nicht geklärt werden. Der Erfolg der Applikation von Vakzinen, bestehend aus Tumorlysat, wird in der Literatur verschieden eingeschätzt. Neben positiven Ergebnisse nach ein- oder mehrmaliger Implantation von Tumorgewebe bzw. Injektion von Tumorlysat-Vakzinen (Roberts, 1970; Vanselow et al., 1988; Tallberg et al., 1994; Carstanjen und Lepage, 1998), berichteten Knottenbelt und Walker (Knottenbelt und Walker, 1995) dagegen über eher negative Resultate. Sie konnten eine Verschlimmerung des Zustandes bereits bestehender Sarkoide, sowie eine Zunahme der Anzahl der Tumore, nach Applikation autologen Tumormaterials beobachten. Bei den Pferden 7 und 18 wurde unter anderem jeweils eine Tumorlysatvakzine appliziert. Über die Art der Vakzine und deren Herstellung liegen jedoch keine wissenschaftlich verwertbaren Angaben vor, so dass fundierte Rückschlüsse auf die Rezidivierung auch an dieser Stelle nicht möglich sind.

Von den hier präsentierten 21 Patienten waren 13 Pferde seit Abschluss der Therapie bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes rezidivfrei und acht Pferde entwickelten nach der in dieser Studie angewendeten Therapie Rezidive. Vier dieser Pferde (Nr. 8, 10, 16 und 19) wurden ausschließlich durch Abbinden der Sarkoide vorbehandelt. Die anderen vier Patienten (Nr. 3, 7, 18 und 20) stellen hingegen echte, therapieresistente Fälle dar, da sie neben dem Abbinden der Tumore unter anderem auch chirurgisch vorbehandelt wurden. Zwei dieser Pferde (Nr. 7 und 18) wurden zusätzlich jeweils mit einer Tumorlysatvakzine vorbehandelt. Bei Pferd 3 wurden außerdem Spinnengift und Homöopathika appliziert. Bei Pferd 18 wurde zudem eine Kryochirurgie durchgeführt.

Von den sechs Pferden mit kleinen Rezidiven (Nr. 3, 7, 8, 10, 18 und 19) sollten 3 auf Wunsch der Besitzer nicht wiederholt behandelt werden (Nr. 3, 8 und 19). Die Rezidive bei Pferd 7 bildeten sich nach zwei Monaten nach ihrem Auftreten ohne weitere Behandlung zurück. Pferd 10 wurde nach Abschluss der Behandlung aus anderen nicht mit dieser Studie im Zusammenhang stehenden, Gründen euthanasiert. Pferd 18 ist nach wiederholter Behandlung nach dem gleichen Schema frei von Rezidiven. Bei zwei Pferden (Nr. 16 und 20) fand eine massive Rezidivierung statt. Bei beiden Pferden wurde eine erneute Behandlung durch die Besitzer abgelehnt.

Die Frage, ob eine wiederholte Therapie nach gleichem Schema bei den acht Pferden mit Rezidiven zum Therapieerfolg geführt hätte, ist nicht zu beantworten. Die negativen Resultate bei den beiden Pferden mit massiver Rezidivierung (Nr. 16 und 20) legen für solche Fälle nahe, bei erneutem Therapieversuch weitere eingehende Untersuchungen zum Vorhandensein eines intakten Immunstatus und einer T-Zell-Aktivität vorzunehmen.

In die Bewertung der Wirksamkeit der Vakzine wurde neben der Art der Vorbehandlung auch die Tumorlokalisierung sowie die Anzahl der Tumore pro Pferd einbezogen. So wurde festgestellt, dass in der untersuchten Patientengruppe eine stark schwankende Anzahl der Sarkoide sowie verschiedene Lokalisation der Tumore vorlag. Die Anzahl der Sarkoide pro Pferd lag zwischen 2 und 89 Sarkoiden. Brandt beschrieb,

dass bei Vorkommen einer größeren Anzahl von Sarkoiden an einem Patienten eine erhöhte Rezidivrate erwartet werden kann (Brandt et al., 1996). Bei den hier untersuchten Patienten konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden. Rezidive traten sowohl bei Patienten mit geringer Anzahl (6 Tiere mit jeweils 3 bis 8 Sarkoiden), als auch mit großer Anzahl (2 Tiere mit jeweils 23 und 35 Sarkoiden) auf. Zudem sind 4 Pferde mit jeweils 10, 20 oder 89 Sarkoiden seit der Behandlung frei von Rezidiven. Eine Korrelation zwischen Wirksamkeit und dem Alter der behandelten Pferde konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht festgestellt werden. So waren sowohl junge als auch ältere Tiere nach der Behandlung sarkoidfrei, beziehungsweise von Rezidiven betroffen.

Da in dieser Studie nur Pferde mit fibroblastischen, beziehungsweise fibroblastisch-gemischten Sarkoiden behandelt wurden, ist eine Aussage über die Wirksamkeit bei anderen Tumorformen an dieser Stelle nicht möglich. Bei den Pferden, die Rezidive aufwiesen, handelte es sich bei den entfernten Tumoren in vier Fällen um fibroblastische und in drei Fällen um fibroblastisch-gemischte Sarkoide. Eine Einschätzung über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Tumortyp und dem Therapieerfolg ist aufgrund der geringen Anzahl der Patienten nicht möglich.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Therapie equiner Sarkoide mittels dendritischer Zellen eine einfach zu applizierende Vakzine ist. Darüber hinaus lassen sich dendritische Zellen nach dem hier beschriebenen Protokoll leicht gewinnen. Die Vakzine hat ihre gute Verträglichkeit für den Patienten in dieser Studie bewiesen. In dieser Studie traten im Zusammenhang mit der Applikation der Vakzine keine unerwünschten schweren Nebenwirkungen auf. Der im Rahmen dieser Studie erreichte Therapieerfolg liegt über den bisherigen Erfahrungswerten am fzmb GmbH bei alleiniger chirurgischer Entfernung equiner Sarkoide sowie über den entsprechenden Angaben in der Literatur (Ragland et al., 1970; Diehl et al., 1988). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit der angewendeten Vakzine und der Vorbehandlung, dem Alter der Tiere, der Anzahl der vorhandenen Sarkoide und sonstigen Faktoren gefunden werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass die hier vorgestellte Therapie bei nicht bereits vorbehandelten Pferden zu einer, gegenüber dieser Studie, noch höheren Heilungsrate führen würde.

Die im Rahmen dieser Studie angewendete Kombinationstherapie aus chirurgischer Entfernung der Sarkoide und anschließender Immuntherapie mittels DC ist demnach ein effektives Therapieverfahren zur Behandlung equiner Sarkoide.

Neben dem Einsatz DC-basierter Therapie equiner Sarkoide, allein oder in Kombination - zum Beispiel mit IL-2, sollten zusammenfassend folgende für sinnvoll erachtete kombinierte Behandlungsmethoden erwähnt werden. Die Erkenntnisse aus der Literatur sowie aus der Erfahrung in der Behandlung equiner Sarkoide bei Pferden am Forschungszentrum für Medizin und Biotechnologie GmbH haben gezeigt, dass eine Therapie bestehend aus verschiedenen kombinierten Methoden gute Heilungsergebnisse erbringen kann. Die primäre Reduktion der Tumorlast durch chirurgische Entfernung des Tumors, mittels Skalpell, Elektrotomie oder Laser, in Kombination mit anschließenden Verfahren steht hierbei an erster Stelle. Als anschließende Verfahren kommen sowohl tumorzellschädigende Methoden, wie beispielsweise die Kryochirurgie, die Applikation von Chemotherapeutika sowie die Radiotherapie, als auch immunstimulatorische Methoden, wie beispielsweise die Immuntherapie, in Betracht. Als nicht erfolgreich in der Therapie equiner Sarkoide kann die Kombination der Radiotherapie mit anschließenden immunstimulatorischen Verfahren, wie der Applikation von Interleukin-2, gesehen werden. Denn die zellschädigende Wirkung der radioaktiven Strahlen betrifft beispielsweise auch die für die Immunantwort essentiellen T-Zellen.

Die DC-basierte Tumorthherapie könnte in der Zukunft an Bedeutung gewinnen. Neben ihrem derzeitigen vielfältigen Einsatz in der Humanmedizin, ist eine weitere Entwicklung für die Veterinärmedizin wünschenswert. Ausgehend von der hohen Sicherheit und den guten Heilungsergebnissen im Rahmen der vorliegenden Studie sind Verbesserungen zu überdenken. Zum einen sollte die Methode zur Gewinnung der DC verbessert und standardisiert werden. Zum anderen sind für die Vergleichbarkeit der Studien objektive Untersuchungen der DC, bezogen auf das Vorhandensein verschiedener Oberflächenantigene und die Stimulationsfähigkeit von Lymphozyten durch DC essentiell. Außerdem ist die Steuerung der Anzahl der überlebenden Gedächtniszellen sowie deren Lebenszyklus noch nicht vollständig geklärt.

Erste humanmedizinische Studien anderer Autoren dazu zeigen jedoch, dass Gedächtniszellen durch die Präsenz von DC und durch die produzierten Zytokine (z.B. Interleukin-2 und 15) bzw. durch die von ihnen präsentierten Antigene stimuliert werden (Ku et al., 2000; van Essen et al., 2000). Weiterhin stehen Untersuchungen über eine optimale zu applizierende Zellzahl, die bestmögliche Antigenpräparation und die zu empfehlende Applikationsart noch aus. Im Hinblick auf das Auftreten von Rezidiven sollte eine ergänzende weiterführende Therapie zur Aufrechterhaltung der Immunantwort erwogen werden. So kann der Einsatz von Interleukin-2 im Anschluss an die DC-Therapie, im Fall therapieresistenter equiner Sarkoide, möglicherweise zu einem besseren Erfolg führen. Denn IL-2 wird bereits erfolgreich lokal zur Behandlung von Tumoren bei Menschen und Tieren eingesetzt (Spoormakers et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit, die Stimulation einer Immunantwort durch DC zu maximieren, stellt die lokale Vorbehandlung mittels Adjuvantien dar, beispielsweise mit der Substanz Imiquimod (Suzuki et al., 2000; Nair et al., 2003).

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Ziel dieser klinischen Studie war der Nachweis der Sicherheit und Wirksamkeit der Therapie equiner Sarkoide durch die Kombination der chirurgischen Entfernung der Tumore und einer Vakzine, die auf autologen dendritischen Zellen basiert. Es fanden 21 bereits vom Haustierarzt auf verschiedene Weise vorbehandelte, an equinen Sarkoiden erkrankte Pferde Eingang in diese Studie.

Zur Herstellung der Vakzine wurden Monozyten aus dem peripheren Blut der Pferde isoliert und unter Zugabe der Zytokine GM-CSF und Interleukin-4 zu dendritischen Zellen differenziert. Ferner wurde ein Tumorlysat hergestellt, mit dem die dendritischen Zellen inkubiert wurden. Die zweimalige Applikation der Vakzine erfolgte im Abstand von 4 Wochen. Im Rahmen dieser hier vorgestellten Therapie traten bei keinem der Pferde sichtbare Nebenwirkungen auf. Von den 21 behandelten Pferden konnten 13 durch die einmalige Durchführung der Kombinationstherapie geheilt werden. Es gibt keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tumore oder der Art der Vorbehandlung und der Wirksamkeit der Therapie.

Die in dieser Arbeit beschriebene Kombinationstherapie stellt aufgrund ihrer Sicherheit und ihrer vergleichsweise hohen Wirksamkeit ein geeignetes Verfahren zur Behandlung fibroblastischer Sarkoide bei Pferden dar, das durch weitere Studien optimiert werden sollte.



# Kapitel 7

## Summary

### **Equine sarcoid therapy using dendritic cells**

The study was designed to proof safety and efficacy of a therapy for equine sarcoids applying a combination of surgical tumor excision and subsequent application of autologous dendritic cells. The 21 horses of this study were all affected by equine sarcoids and pre-treated by their local veterinary surgeon using different methods.

To obtain the vaccine peripheral blood monocytes were isolated and differentiated with the cytokines granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). Next a tumor lysate was produced and incubated with the DC prior to application. The injection of the vaccine was performed 4 weeks apart. No adverse side effects have been observed. 13 of the 21 treated horses may be regarded healed by a single execution of the combinational therapy. There is no evidence for a correlation between the number of tumors or the method used for pre-treatment and the efficacy of this therapy.

Due to its safety and comparably high efficacy the combinational therapy described here seems well suitable for the treatment of fibroblastic sarcoids in horses and should be optimized through subsequent studies.



# Kapitel 8

## Abkürzungen

Abkürzungen	
Abkürzung	Bedeutung
Abb	Abbildung
AC	akzessorische Zelle
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BDV	Border Disease Virus
BPV	Bovines Papillomvirus
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
cm	Zentimeter
$cm^2$	Quadratzenimeter
$cm^3$	Kubikzenimeter
CVLP	chimäre virusähnliche Partikel
Co	Cobalt
$CO_2$	Kohlendioxid
CRPV	Cottontailrabbit Papillomavirus
DC	Dendritische Zelle (englisch: dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fortsetzung auf der folgenden Seite	

Abkürzung	Bedeutung
EHV	Equines Herpes Virus
EPV	Equines Papillomvirus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FIV	Felines Immundefizienz Virus
g	Gramm
ggr	geringgradig
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-cell stimulating factor
hgr	hochgradig
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes Simplex Virus
Hz	Hertz
I	Iod
iDC	immature dendritische Zelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Ir	Iridium
i. v.	intravenös
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
mDC	mature dendritische Zelle
mg	Milligramm
mgr	mittelgradig
MHC	Major histocompatibility complex
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
Mo	Monozyten
MoDC	Monocyte derived dendritic cell
mW	Milliwatt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
Fortsetzung auf der folgenden Seite	

Abkürzung	Bedeutung
$\mu\text{m}$	Mikrometer
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OP	Operation
PAS	Periodic Acid Schiff
PBM	periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDFG	Platelet-derived growth factor
PDT	Photodynamische Therapie
post-op	post operationem
prä-op	prä operationem
Ra	Radium
Rn	Radon
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
TAP	Transporter associated with antigen presentation
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
VEE	Venezuelan Equine Encephalitis
WHS	Wundheilungsstörung



# Literaturverzeichnis

- O. Aichinger. Behandlung des equinen Sarkoids mit der Aktiven Patientenspezifischen Immuntherapie (APSI). *Tierärztl. Umsch.*, 53: 353–355, 1998.
- S.M. Ali und M. Olivo. Bio-distribution and subcellular localization of hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 21:531–540, 2002.
- S.M. Ali, S.K. Chee, G.Y. Yuen und M. Olivo. Photodynamic therapy induced fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.*, 9:257–270, 2002.
- E. Amtmann und G. Sauer. Selective killing tumor cells by xanthates. *Cancer Lett.*, 35:237–244, 1987.
- E. Amtmann, H. Müller und G. Sauer. Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papilloma virus DNA. *J. Virol.*, 35:962–964, 1980.
- E. Amtmann, K. Müller, A. Knapp und G. Sauer. Reversion of bovine papilloma-induced and immortalization by a xanthate compound. *Expl. Cancer Res.*, 161:541–550, 1985.
- J. Angelos, Y. Oppenheim, W. Rebhun, H.O. Mohammed und F. Antczak. Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Anim. Genet.*, 19(4):417–425, 1988.
- A. Antonsson, O. Forslund, H. Ekberg, G. Sterner und B.G. Hansson. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J. Virol.*, 74(24):11636–11641, 2000.
- A. Antonsson, C. Erfurt, K. Hazard, V. Holmgren, M. Simon, A. Kataoka, S. Hossain, C. Hakangard und B.G. Hansson. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J. Gen. Virol.*, 84:1881–1886, 2003.
- B.P. Babbitt, P.M. Allen, G. Matsueda, E. Haber und E.R. Unanue. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, 317:359–361, 1985.

- J. Banchereau und R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392:245–252, 1998.
- R.C. Bast, B. Zbar, T. Borso und H.J. Rapp. BCG and cancer (Part One). *New Engl. J. Med.*, 290:1413–1420, 1974a.
- R.C. Bast, B. Zbar, T. Borso und H.J. Rapp. BCG and cancer (Part Two). *New Engl. J. Med.*, 290:1458–1469, 1974b.
- D. Bell, J. Young und J. Banchereau. Dendritic cells. *Adv. Immunol.*, 72:255–310, 1999.
- A.L. Bertone und J.J. McClure. Therapy for sarcoids. *Comp. Cont. Educ. pract. Vet.*, 12:262–265, 1990.
- C. Bonnefont-Rebeix, C.M. deCarvalho, J. Bernaud, L. Chabanne, T. Marchal und D. Rigal. CD86 molecule is a specific marker for canine monocyte-derived dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 109(1-2):167–176, 2006.
- K. Brandt, B. Ohnesorge, D. Döpfer und E. Deegen. Equine Sarkoide - Vorkommen und Behandlung. *Pferdeheilkunde*, 12(5):739–748, 1996.
- W.J. Brewer und J.M. Turrel. Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of fibrosarcomas in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 181:146–150, 1982.
- P. Brossart, S. Wirths, G. Stuhler, V.L. Reichardt, L. Kanz und W. Brugger. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*, 96(9):3102–3108, 2000.
- M.P. Brown. *Current therapy in equine medicine*, chapter Surgical treatment of equine sarcoid, pages 534–539. WB Saunders Co., Philadelphia, 1983.
- R. Bujdoso, J. Hopkins, B.M. Dutia, P. Young und I. McConnell. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J. Exp. Med.*, 170:1285–1301, 1989.
- E.A. Carr, A.P. Theon, B.R. Madewell, S.M. Griffey und M.E. Hitchcock. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western unated states. *Am. J. Vet. Res.*, 62:741–744, 2001.
- C.P. Carrasco, R.C. Rigden, R. Schaffner, H. Gerber, V. Neuhaus, S. Inumaru, H. Takamatsu, G. Bertoni, K.C. McCullough und A. Summerfield. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology*, 104:175–184, 2001.

- C.P. Carrasco, R.P. Rigden, I.E. Vincent, C. Balmelli, M. Ceppi, O. Bauhofer, V. Tache, B. Hjertner, F. McNeilly und H.G. van Gennip. Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J. Gen. Virol.*, 85:1633–1641, 2004.
- B. Carstanjen und M.-F. Lepage. Equines Sarkoid (Teil 2): Therapiemöglichkeiten und Prognosen. *Prakt. Tierarzt*, 79(8):730–742, 1998.
- B. Carstanjen, O.M. Lepage und P. Jordan. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub> - Laser excision and / or vaporization as a therapy for sarcoids. a retrospective study on 60 cases. *Vet. Surg.*, 25:268, 1996.
- C.M. Celluzzi, J.I. Mayordomo, W.J. Storkus, M.T. Lotze und L.D. Falo Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.*, 183(1):283, 1996.
- G. Chambers, V.A. Ellsmore, P.M. O'Brien, S.W.J. Reid, S. Love, M.S. Campo und L. Nasir. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J. Gen. Virol.*, 84:1055–1062, 2003.
- R.L. Cowell und R.D. Tyler. *Diagnostic cytology and hematology of the horse*, volume 2. Mosby, Inc., St. Louis, Missouri, USA, 2002.
- M.R. Crittenden, U. Thanarajasingam, R.G. Vile und M.J. Gough. Intratumoral immunotherapy: using the tumour against itself. *Immunology*, 114:11–22, 2005.
- E. Dahme, E. Weiss und A. and Hafner-Marx. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag, 6. edition, 2007.
- E.A. Danna, P. Sinha, M. Gilbert, V.K. Clements, B.A. Pulaski und S. Ostrand-Rosenberg. Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease. *Cancer Res.*, 64:2205–2211, 2004.
- G. Davidson. Providing positive outcomes through compounding for animal cancer patients. *Int. J. Pharm. Comp.*, 4(4):264–274, 2000.
- G. Demir, H.O. Klein und N. Tuzuner. Low dose daily rhGM-CSF application activates monocytes and dendritic cells in vivo. *Leuk. Res.*, 27: 1105–1108, 2003.
- M. Diehl, M. Vingerhoets und D. Stornetta. Spezifische Methoden zur Entfernung des Equinen Sarkoides. *Prakt. Tierarzt*, Collegium Veterinarium XVIII:14–17, 1988.
- D. DiMaio und D. Mattoon. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, 20(54):7866–7873, 2001.

- I. Eckert. *Veterinärmedizinische Parasitologie*, volume 4. Parey Verlag, 1992.
- H. Eickmeier. Gesundheitsschäden durch Arzneimittel. *Tieraerztliche Praxis*, 9:141–151, 1981.
- A.M. Faccini, G.H. Cairney, M. and Ashrafi, M.E. Finbow, M.S. Campo und J.D. Pitts. The bovine papillomavirus type 4E8 protein binds to ductin and causes loss of gap junctional intercellular communication in primary fibroblasts. *J. Virol.*, 70:9041–9045, 1996.
- H.E. Farris, F.T. Fraunfelder und C.H. Frith. A simple cryosurgical unit for treatment of animal tumors. *Vet. Med. / Small Anim. Clin.*, 70 (3):299–302, 1975.
- U. Fassnacht, A. Ackermann, P. Staeheli und J. Hausmann. Immunization with dendritic cells can break immunological ignorance toward a persisting virus in the central nervous system and induce partial protection against intracerebral viral challenge. *J. Gen. Virol.*, 85: 2379–2387, 2004.
- R.C. Fields, K. Shimizu und J.J. Mule. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(16):9482–9487, 1998.
- L. Filgueira, F.O. Nestle, M. Rittig, H.I. Joller und P. Groscurth. Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *J. immunol.*, 157:2998–3005, 1996.
- A. Flores-Langarica, S. Meza-Perez, J. Calderon-Amador, T. Estrada-Garcia, G. MacPherson, S. Lebecque, S. Saeland, R. Steinman und L. Flores-Romo. Network of dendritic cells within the muscular layer of the mouse intestine. *PNAS*, 102(52):19039–19044, 2005.
- G. Freer, D. Matteucci, P. Mazzetti, L. Bozzacco und M. Bendinelli. Generation of feline dendritic cells derived from peripheral blood monocytes for in vivo use. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(10):1202–1208, 2005.
- B.J. Gitlitz, A.S. Beldegrun, A. Zisman, D.H. Chao, A.J. Pantuck, A. Hinkel, P. Mulders, N. Moldawer, C.L. Tso und R.A. Figlin. A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J. Immunother.*, 26(5):412–419, 2003.
- R.S. Goldszmid, J. Idoyaga, A.I. Bravo, R.M. Steinman, J. Mordoh und R. Wainstok. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against B16-melanoma. *J. Immunol.*, 171:5940–5947, 2003.

- G. Gross. Virus infections of the skin and mucous membranes and malignant tumors. *Z. Hautkr.*, 60(23):1872–1877, 1985.
- S.A. Hammond, D. Horohov und R.C. Montelaro. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 71:197–214, 1999.
- J. Hopkins, B.M. Dutia, R. Bujdoso und I. McConnell. In vivo modulation of CD1 and MHC class II expression by sheep afferent lymph dendritic cells. comparison of primary and secondary immune responses. *J. Exp. Med.*, 170:1303–1318, 1989.
- J.E. Houlton. Treatment of periocular equine sarcoids. *Equine Vet. J. Suppl.*, 2:117–122, 1983.
- C.J. Howard, G.P. Brooke, D. Werling, P. Sopp, J.C. Hope, K.R. Parsons und R.A. Collins. Dendritic cells in cattle: phenotype and function. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 72:119–124, 1999.
- S. Howarth. Sarcoids: the story so far. *Veterinary Annual*, 30:145–154, 1990.
- F.J. Hsu, C. Benike, F. Fagnoni, T.M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E.G. Englemann und R. Levy. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 1:5–58, 1996.
- K. Inaba, M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu und R.M. Steinman. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 176(6):1693–1702, 1992.
- C. Jackson. Incidence and pathology of tumors of domesticated animals in south africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, 6:3, 1936.
- S. Jeckel. *Aufklärung der Rolle viraler Proteine für die Entstehung und Progression papillomvirusinduzierter Tumoren im Kaninchenmodell.* PhD thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2003.
- R. Johne, S. Mattil-Fitz, R. Raue, D. Scharner, L. Gissmann, M. Müller, S. Überschär und H. Müller. Immuntherapie des equinen Sarkoids. *Vet. Med. Rep.*, V9(28):12, 2004.
- J.R. Joyce. Cryosurgical treatment of tumors of horses and cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 168:226–229, 1976.
- T.W. Jungi. *Zelluläre und molekulare Grundlagen der Immunologie.* Institut für Veterinär - Virologie, Universität Bern, Schweiz, 1996.

- T.W. Jungi. *Klinische Veterinärimmunologie*, volume 1. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 2000.
- R. Kaaden und H. Mahnel. *Infektions- und Seuchenlehre*, volume 6, chapter Medizinische Mikrobiologie. Enke Verlag, Stuttgart, 1993.
- J.A. Khan und S. Yaqin. Dendritic cell therapy with improved outcome in glioma multiforme - a case report. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE B*, 7(2):114–117, 2006.
- S.M. Kiertscher, J. Luo, S.M. Dubinett und M.D. Roth. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, 164(3):1269–1276, 2000.
- S.M. Kiertscher, B.J. Gitlitz, R.A. Figlin und M.D. Roth. Granulocyte -, macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4 expand and activate type-1 dendritic cells (DC1) when administered in vivo to cancer patients. *Int. J. Cancer*, 107:256–261, 2003.
- I. Kimber und M. Cumberbatch. Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 117:137–146, 1992.
- W.R. Klein. BCG-Immuntherapie für das Sarkoid beim Pferd. *Prakt. Tierarzt*, Collegium Veterinarium XVIII:17–18, 1987.
- D.C. Knottenbelt. Skin neoplasia: Sarcoïd. volume 9, Italian Association of Equine Veterinarians, Pisa, Italien, 2003.
- D.C. Knottenbelt. What does the effect of Tazarotene on sarcoïd tell us about the nature of the disease. In *3. Leipziger Tierärztekongress*, volume 32, Leipzig, 2005. European College of equine internal medicine, Schattauer Verlag.
- D.C. Knottenbelt und R. Pascoe. *Farbatlas der Pferdekrankeiten*, volume 3. Schlütersche Verlag, 2000.
- D.C. Knottenbelt und J.A. Walker. Topical treatment of the equine sarcoïd. *Equine vet. Educ.*, 6:72–75, 1995.
- D.J. Krahwinkel, D.M. Merkley und D.R. Howard. Cryosurgical treatment of cancerous and noncancerous diseases of dog, horses and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 169(2):201–207, 1976.
- C.C. Ku, M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler und P. Marrack. Control of homeostasis of CD81 memory T-cells by opposing cytokines. *Science*, 288:675–678, 2000.
- D.W. Kufe, R.E. Pollock, R.R. Weichselbaum, R.S. Bast, T.S. Gansler, J.F. Holland und E. Frei. *Cancer Medicine*, volume 6. BC Decker Inc., 2003.

- W.D. Lancaster und C. Olson. Animal papillomaviruses. *Microbiol. Rev.*, 46:191–207, 1982.
- J.G. Lane. Treatment of equine sarcoid. *Equine Vet. J.*, 9:127–133, 1977.
- R.P. Lauener, S.M. Goyert, R.S. Geha und D. Vercelli. Interleukin-4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 20:2375–2381, 1990.
- J.D. Lavach, K.E. Sullins, R.A. Roberts, G.A. Severin und D.C. Lucker. BCG treatment of periocular sarcoid. *Equine Vet. J.*, 17:445–448, 1985.
- M.-F. Lepage, B. Carstanjen und C. Tschärner. Equines Sarkoid (Teil 1): Ursache, Diagnose, Differentialdiagnose. *Prakt. Tierarzt*, 79(7):627–636, 1998.
- L.M. Liao, R.M. Prins, S.M. Kiertscher, S.K. Odesa, T.J. Kremen, A.J. Giovannone, J.-W. Lin, D.J. Chute, P.S. Mischel, T.F. Cloughesy und M.D. Roth. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.*, 11(15):5515–5525, 2005.
- M.F. Lipscomb und B.J. Masten. Dendritic cells: Immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.*, 82:97–130, 2002.
- B. Ludewig, A.F. Ochsenbein, B. Odermatt, D. Paulin, H. Hengartner und R.M. Zinkernagel. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, 191(5):795–803, 2000.
- G.H. MacDonald und R.E. Johnston. Role of dendritic cell targeting in venezuelan equine encephalitis virus pathogenesis. *J. Virol.*, 74(2): 914–922, 2000.
- A. Mackensen, B. Herbst, J.L. Chen, G. Kohler, C. Noppen, W. Herr, G.C. Spagnoli, V. Cerundolo und A. Lindemann. Phase-I-study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Cancer*, 86(3):385–392, 2000.
- M.G. Manz, D. Traver, T. Miyamoto, I.L. Weissman und K. Akashi. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97(11):3333–3341, 2001.
- B. Marchetti, G.H. Ashrafi, E. Tsimonaki, P.O. O'Brien und M.S. Campo. The papillomavirus oncoprotein E5 retains the major histocompatibility class I in the golgi apparatus and prevents its transport to the cell surface. *Oncogene*, 21:7808–7816, 2002.

- A. Martens, A. deMoor, J. Demeulemeester und R. Ducatelle. Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Res. Vet. Sci.*, 69:295–300, 2000a.
- A. Martens, A. deMoor, E. Waelkens, W. Merlevede und P. deWitte. In vitro and in vivo evaluation of hypericin for photodynamic therapy of equine sarcoids. *Vet. J.*, 159(1):77–84, 2000b.
- A. Martens, A. deMoor, J. Demeulemeester und L. Peelman. Polymerase chain reaction analysis of the surgical margins of equine sarcoids for bovine papilloma virus DNA. *Vet. Surg.*, 30(5):460–467, 2001.
- E. Marti, S. Lazary, D.F. Antczak und H. Gerber. Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine vet. J.*, 25(5):397–407, 1993.
- P. Matzinger. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:991–1045, 1994.
- S. Mauel. *Klonierung und Expression von eq.(IFN) , eq.(GM-CSF) und eq.(IL-4) und deren Einfluß auf die monozytären Zellen des Pferdes.* PhD thesis, Freie Universität Berlin, 2002.
- S. Mauel, F. Steinbach und H. Ludwig. Monocyte-derived dendritic cells from horses differ from dendritic cells of humans and mice. *Immunology*, 117(4):463–473, 2006.
- J.I. Mayordomo, T. Zorina, W.J. Storkus, L. Zitvogel, C. Celluzzi, L.D. Falo, S.T. Melief, C.J. and Istad, W.M. Kast und A.B. DeLeo. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *Nat. Med.*, 1: 1297, 1995.
- A.A. McBride, A. Dlugosz und C.C. Baker. Production of infectious bovine papillomavirus from cloned viral DNA by using an organotypic raft / xenograft technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:5534–5539, 2000.
- C.T. McCauley, J.F. Hawkins, S.B. Adams und J.F. Fessler. Use of a carbon dioxide laser for surgical management of cutaneous masses in horses: 32 horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220(8):1192–1197, 2002.
- J.M. McConghy, R.E. Davis und D.R. Hodgson. Equine sarcoid: a persistent therapeutic challenge. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 16(8): 1022–1031, 1994.
- M. McEntee. Eumycotic mycetoma: Review and report of a cutaneous lesion caused by *Pseudoallescheria boydii* in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191(11):1459–1461, 1987.

- M.F. McEntee. Equine cutaneous mastocytoma: morphology, biological behaviour and evolution of the lesion. *J. Comp. Pathol.*, 104(2):171–178, 1991.
- D.J. McKeever, N.D. MacHugh, B.M. Goddeeris, E. Awino und W.I. Morrison. Bovine afferent lymph veiled cells differ from blood monocytes in phenotype and accessory function. *J. Immunol.*, 147:3703–3709, 1991.
- M.C. McMullan. *Equine medicine and surgery*, volume 3. Am. Vet. Publ., Santa Barbara, Californien, 1982.
- H.O. Mohammed, W.C. Rebhun und D.F. Antczak. Factors associated with the risk of developing sarcoid tumors in horses. *Equine vet. J.*, 24:165–168, 1992.
- M.A. Morse, S.K. Nair, P.J. Mosca, A.C Hobeika, T.M. Clay, Y. Deng, D. Boczkowski, A. Proia, D. Neidzwiecki, P.A. Clavien, H.I. Hurwitz, J. Schlom, E. Gilboa und H.K. Lyerly. Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest.*, 21(3):341–349, 2003.
- G.P. Murphy, B.A. Tjoa, S.J. Simmons, M.K. Rogers, G.M. Kenny und J. Jarisch. Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate*, 43(1):59–62, 1999.
- J.M. Murphy, G.A. Severin, J.D. Lavach, D.I. Hepler und D.C. Lueker. Immunotherapy in ocular equine sarcoid. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174(3):269–272, 1979.
- S. Nair, C. McLaughlin, A. Weizer, Z. Su, D. Boczkowski, J. Dannull, J. Vieweg und E. Gilboa. Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation. *J. Immunol.*, 171:6275–6282, 2003.
- L. Nasir und S.W.J. Reid. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res.*, 61(2):171–175, 1999.
- F.O. Nestle, S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg und D. Schadendorf. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 4(3):328–332, 1998.
- M.K. O´Banion, M.E. Reichmann und J.P. Sundberg. Cloning and characterization of an equine cutaneous papillomavirus. *J. Virol.*, 152:100–109, 1986.
- C. Olson. Equine sarcoid, a cutaneous neoplasm. *Am. J. vet. Res.*, 9:333–341, 1948.

- C. Olson und R.H. Cook. Cutaneous sarkoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 77:281–284, 1951.
- N. Otten, E. Marti, C. Soderstrom, E. Amtmann, D. Burger, H. Gerber und S. Lazary. Experimental treatment of equine sarcoid using a xanthate compound and recombinant human tumour necrosis factor alpha. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 41(10):757–765, 1994.
- R.R. Owen und D.W. Jagger. Clinical observations of the use of BCG cell wall fraction for treatment of periocular and other equine sarcoids. *Vet. Rec.*, 120:548–552, 1987.
- R. Paillot, F. Laval, J.-C. Audonnet, C. Andreoni und V. Juillard. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology*, 102:396–404, 2001.
- S.E. Palmer und L.D. McGill. Thermal injury by in vitro incision of equine skin with elektrosurgery, radiosurgery, and a carbon dioxide laser. *Vet. Surg.*, 21(5):348–350, 1992.
- R.R. Pascoe und P.M. Summers. Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in horses in south east queensland. *Equine Vet. J.*, 13(4):235–239, 1981.
- D.J. Peace und M.A. Cheever. Toxicity and therapueitic efficacy of high-dose Interleukin-2. *J. Exp. Med.*, 169(1):161–173, 1989.
- R.St. Peebles Jr. und B.S. Graham. Viruses, dendritic cells and the lung. *Respirat. Res.*, 2(4):245–249, 2001.
- J.H. Peters, S. Ruhl und D. Friedrichs. Veiled accessory cells deduced from monocytes. *Immunobiology*, 176:154–166, 1987.
- J.H. Peters, R. Gieseler, B. Thiele und F. Steinbach. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunology today*, 17(6):273–276, 1996.
- A. Pinzon-Charry, T. Maxwell, M.A. McGuckin, C. Schmidt, C. Furnival und J.A. López. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 8(1):1–10, 2005.
- S. Porcelli, C.T. Morita und M.B. Brenner. CD1b restricts the response of human CD4-8-T-lymphocytes to a microbial antigen. *Nature*, 360:593–597, 1992.
- J. Qiu, G.-W. Li, Y.-F. Sui, H.-P. Song, S.-Y. Si und W. Ge. Heat-shocked tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce effective anti-tumor immune response in vivo. *World J. Gastroenterol.*, 12(3):473–478, 2006.

- W.L. Ragland, G.H. Keown und J.R. Gorham. An epizootic of equine sarcoid. *Nature*, 210:1399, 1966.
- W.L. Ragland, G.H. Keown und G.R. Spencer. Equine sarcoid. *Equine Vet. J.*, 2:2–11, 1970.
- E. Raymond, S. Faivre, J.M. Woynarowski und S.G. Chaney. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol.*, 25:4–12, 1998.
- S.W.J. Reid. *The equine sarcoid: Molecular and epidemiological studies in Equus asinus*. PhD thesis, University of Glasgow, 1992.
- S.W.J. Reid und H.O. Mohammed. Longitudinal and cross-sectional studies to evaluate the risk of sarcoid associated with castration. *Can. J. Vet. Res.*, 61:89–93, 1997.
- S.W.J. Reid, K.T. Smith und W.H.F. Jarret. Detection, cloning and characterisation of papillomaviral DNA present in sarcoid tumours of *Equus asinus*. *Vet. Rec.*, 135:430–432, 1994.
- C. Reis e Sousa, P.D. Stahl und J.M. Austyn. Phagocytosis of antigens by langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.*, 178:509–519, 1993.
- X. Renjifo, C. Howard, P. Kerkhofs, M. Denis, J. Urbain, M. Moser und P.P. Pastoret. Purification and characterization of bovine dendritic cells from peripheral blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 60(1-2): 77–88, 1997.
- A.M. Rice, K.L. Jones und D.N. Hart. DC preparations for therapy. *Cytotherapy*, 6(2):99–104, 2004.
- D.W. Roberts. Experimental treatment of equine sarcoid. *Vet. Med. / Small Anim. Clin.*, 65:67–70, 1970.
- N.E. Robinson. *Current Therapy in Equine Medicine*, volume 4. Philadelphia, USA, 1997.
- I.M. Roitt. *Leitfaden der Immunologie*, volume 4. Blackwell Wissenschaft, Berlin, 1993.
- M.D. Roth, B.J. Gitlitz, S.M. Kiertscher, A.N. Park, M. Mendenhall, N. Moldawer und R.A. Figlin. Granulocyte Macrophage Colony-stimulating factor and Interleukin-4 enhance the number and antigen-presenting activity of circulating CD141 and CD831 cells in cancer patients. *Cancer Res.*, 60:1934–1941, 2000.
- N. Rougier, D. Schmitt und C. Vincent. IL-4 addition during differentiation of CD34 progenitors delays maturation of dendritic cells while promoting their survival. *Eur. J. Cell Biol.*, 75(3):287–293, 1998.

- A. Saalmueller, J.K. Lunney, C. Daubenberger, W. Davis, U. Fischer, T.W. Gobel, P. Griebel, E. Hollemweguer, T. Lasco, R. Meister, H.J. Schubert, K. Sestak, P. Sopp, F. Steinbach, W. Xiao-Wei und B. Aasted. Summary of the animal homologue section of hlda8. *Cell Immunol.*, 236(1-2):51–58, 2005.
- F. Sallusto und A. Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 179:1109–1118, 1994.
- J.v. Sandersleben, K. Dämmrich und E. Dahme. *Pathologische Histologie der Haustiere*. Gustav Fischer Verlag Jena, 3. edition, 1989.
- A. Schlamp. *Induktion einer potenten antitumoralen Immunantwort durch CpG-aktivierte dendritische Zellen: Vergleich zweier muriner Kolonkarzinom-Modelle*. PhD thesis, Ludwig - Maximilians - Universität München, 2005.
- B.I. Schnabel. *Untersuchungen zur erblichen Disposition des equinen Sarkoids beim Haflinger und zur Tumorlokalisierung bei Warmblutpferden*. PhD thesis, Freie Universität Berlin, 2000.
- M. Schnurr, P. Galambos, C. Scholz, F. Then, M. Dauer, S. Endres und A. Eigler. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res.*, 61:6445–6450, 2001.
- M. Schott, J. Feldkamp, M. Klucken, G. Kobbe, W.A. Scherbaum und J. Seissler. Calcitonin-specific antitumor immunity in medullary thyroid carcinoma following dendritic cell vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.*, 51:11–12, 2002.
- C. Schuett und R. Schumann. The endotoxin receptor CD14. *Immun. Infekt.*, 21:36–41, 1993.
- D.W. Scott. *Large Animal Dermatology*. Saunders, Philadelphia, USA, 1988.
- H.B. Seim. Mechanism of cold-induced cellular death. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, 10:755–762, 1980.
- J.S. Serody, E.J. Collins, R.M. Tisch, J.J. Kuhns und J.A. Frelinger. T-cell-activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery. *J. Immunol.*, 164(9): 4961–4967, 2000.
- E. Siedek, S. Little, S. Mayall, N. Edington und A. Hamblin. Isolation and characterisation of equine dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 60:15–31, 1997.

- E.M. Siedek, M. Whelan, N. Edington und A. Hamblin. Equine herpesvirus type 1 infects dendritic cells in vitro: stimulation of T-lymphocyte proliferation and cytotoxicity by infected dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 67:17–32, 1999.
- M. Sloet und D.C. Knottenbelt. *The practitioners Guide to Equine Dermatology*. Uitgeverij Libre BV, Leeuwarden, Niederlande, 2001.
- S.H. Smith, M.H. Goldschmidt und P.M. McManus. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.*, 39(6):651–678, 2002.
- T.J. Spoormakers, W.R. Klein, J.J. Jacobs, T.S. Van Den Ingh, J.W. Kotten und W. Den Otter. Comparison of the efficacy of local treatment of equine sarcoids with IL-2 or cisplatin/IL-2. *Cancer Immunol. Immunother.*, 52(3):179–184, 2003.
- C.J. Spry, A.J. Pflug, G. Janossy und J.H. Humphrey. Large mononuclear (veiled) cells like “Ia-like“ membrane antigens in human afferent lymphodi. *Clin. Exp. Immunol.*, 39:750–755, 1980.
- A.A. Stannard und L.T. Pulley. *Tumors in Domestic Animals*, volume 3, chapter Tumors of the skin and soft tissues. University of California Press, Berkley, 1990.
- A.M. Stark, H.-H. Hugo, R. Buhl und H.M. Mehdorn. Tumoren peripherer Nerven. *Dtsch. Ärzteblatt*, 99(14):A–928–933, 2002.
- F. Steinbach, B. Krause und B. Thiele. Monocyte derived dendritic cells (MODC) present phenotype and functional activities of langerhans cells/dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 378:151–153, 1995.
- F. Steinbach, K. Borchers, P. Ricciardi-Castagnoli, H. Ludwig, G. Stingl und A. Elbe-Bürger. Dendritic cells presenting equine herpesvirus-1 antigens induce protective antiviral immunity. *J. Gen. Virol.*, 79:3005–3014, 1998.
- F. Steinbach, R. Stark, S. Ibrahim, E.A. Gawad, H. Ludwig, J. Walter, U. Commandeur und S. Mael. Molecular cloning and characterization of markers and cytokines for equid myeloid cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108(1-2):227–236, 2005.
- R.M. Steinman. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 9:271–296, 1991.
- R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity: Enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt. Sinai J. Med.*, 68(3):160–166, 2001.
- R.M. Steinman und Z.A. Cohn. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.*, 173:1142–1162, 1973.

- R.M. Steinman und M.C. Nussenzweig. Avoiding horror autotoxic: The importance of dendritic cells in peripheral T-cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(1):351–358, 2002.
- R.M. Steinman, S. Turley, I. Mellman und K. Inaba. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.*, 191(3):411–416, 2000.
- A.C. Strafuss, J.E. Smith, J.D. Dennis und H.D. Anthony. Sarcoid in horses. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 68:1246–1247, 1973.
- J.E. Sullins, J.D. Roberts, S.M. Lavach und G.A. Severin. Equine sarcoid. *Equine Pract.*, 8:21–27, 1986.
- J.P. Sundberg, T. Burnstein, E.H. Page, W.W. Kirkham und F.R. Robinson. Neoplasms of equidae. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 170:150–152, 1977.
- H. Suzuki, B. Wang, G.M. Shivji, P. Toto, P. Americo, M.A. Tomai, R.L. Miller und D.N. Sauder. Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 114(1):135–141, 2000.
- T. Tallberg, R.E. Kinnunen, A. Palkama, E.M. Saario und G. Borgström. Equine sarcoid successfully treated by bio-immunotherapy. *Dtsch. Zschr. Onkol.*, 26(2):34–40, 1994.
- J.N. Tarwid, P.B. Fretz und E.G. Clark. Equine sarcoids: A study with emphasis on pathologic diagnosis. *The Compendium on Continuing Education*, 7(5):293–299, 1985.
- F.G. Taylor und M.H. Hillyer. *Klinische Diagnostik in der Pferdepraxis*, volume 1. Schlütersche Verlag, Hannover, 2001.
- A.P. Theon und J.R. Pascoe. Iridium-192 interstitial brachytherapy for equine periocular tumours: treatment results and prognostic factors in 115 horses. *Equ. vet. J.*, 27(2):117–121, 1994.
- A.P. Theon, J.R. Pascoe, G.P. Carlson und D.N. Krag. Intratumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 202(2):261–167, 1993.
- B.O. Torrontegui und S.W.J. Reid. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine vet. Educ.*, 6(2):85–88, 1994.
- K. Trennfeld, P.B. Spradbrow und Vanselow B. Sequences of papillomavirus DNA in equine sarcoids. *Equine Vet. J.*, 17:44–452, 1985.

- J.M. Turrel und P.D. Koblik. Techniques of after loading iridium-192 interstitial brachytherapy in veterinary medicine. *Vet. Radiol.*, 24: 278–283, 1983.
- J.M. Turrel, S.M. Stover und J. Gyorgyfalvy. Iridium-192 interstitial brachytherapy of equine sarcoid. *Vet. Radiol.*, 26:20–24, 1985.
- D. van Essen, P. Dullforce, T. Brocker und D. Gray. Cellular interactions involved in Th cell memory. *J. Immunol.*, 165(7):3640–3646, 2000.
- B.A. Vanselow, I. Abetz und A.R. Jackson. BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid. *Equine vet. J.*, 20:444–447, 1988.
- J.L. Voss. Transmission of equine sarcoid. *Am. J. Vet. Res.*, 30:183–191, 1969.
- A. Vrins, M. Paradis und D. Scott. 2. partie: les affections papuleuses et nodulaires et les boutons de chair. *Prat. Vet. Equine*, 24(3):157–162, 1992.
- M. Walker, W. Adams und J. Hokinson. Iridium-192 brachytherapy for equine sarcoid, one and two year remission rates. *Vet. Radiol.*, 32: 206–208, 1991.
- M.A. Wallet, P. Sen und R. Tisch. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin. Med. Res.*, 3(3):166–175, 2005.
- E. Weiss. *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*. Parey Verlag, 8. edition, 1990.
- D.G. Wilson, L.C. Peyton und G. Wolf. Immediate split-thickness autogenous skin grafts in the horse. *Vet. Surg.*, 16(2):167–171, 1987.
- M. Wyman, M. Rings, M. Tarr und C. Alden. Immunotherapy in equine sarcoid: a report of two cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 171:449–451, 1977.
- J.A. Yager und D.W. Scott. *Pathology of Domestic Animals*, volume 4, chapter The skin and appendages. Academic Pres, San Diego, 1994.
- R. Yamanaka, J. Homma, N. Yajima, N. and Tsuchiya und M. Sano. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: Results of a clinical phase i / ii trial. *Clin. Cancer Res.*, 11(11):4160–4167, 2005.
- J.W. Yewdell und J.R. Bennink. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T-lymphocytes. *Adv. Immunol.*, 52:1–123, 1992.

J. Young, L. Koulova, S. Soergel, E. Clark, R. Steinman und B. Dupont. The B7 - BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, 90:1315–1332, 1992.

## EIGENE VERÖFFENTLICHUNG

Teile der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:

- Kussmann, S. (Bischoff, S.) und Wilke, I.: Therapeutische Vakzinierung mit Dendritischen Zellen gegen das Sarkoid des Pferdes. 2. Göttinger Workshop Tumorummunologie, 04.07.2003 (Vortrag)

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Falko Steinbach für die persönliche Förderung meiner Arbeit. Er hat mich ermutigt, meine Ergebnisse vorzustellen und mich dabei stets tatkräftig unterstützt.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. Christoph Werner für seine Starthilfe beim praktischen Teil meiner Arbeit und seinen Zuspruch, dieses interessante Thema umfassend zu bearbeiten.

Dr. Ingo Wilke danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und seinen fachlichen Rat.

Für die hervorragenden histopathologischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. Matthias Weber aus dem Labor für Veterinärmedizinische Diagnostik, Bad Salzungen.

Ganz herzlich danke ich meinen Kollegen am fzmb, Dr. Dirk Barnewitz für die Erlaubnis, dieses Thema bearbeiten zu dürfen, seine fachliche Unterstützung, die vielen guten Gespräche und den OP-Gesang ("Märkische Heide, märkischer Sand..."); Dr. Carmen Klein für ihre wissenschaftlichen Ratschläge und ihre persönliche Unterstützung; Michaela Neumann und Dr. Ina Richter für ihre Hilfestellungen bei dem Laborteil dieser Arbeit, Dr. Igor Ponomarew für seinen fachlichen Rat und die zeitweise Überlassung seines Labors; nicht zuletzt den anderen Kollegen und Kolleginnen für ihre Hilfe, die mir so oft die Arbeit erleichtert hat, und die vielen netten Stunden, die wir zusammen verbracht haben - Marlen Fallak, Mario Beck, Kristin Zänker, Michaela Nonn, Anja Krey, Nancy Krawczyk, Berit Hess und Dr. Anke Mülverstedt.

Herrn Prof. Dr. Hinrich Peters sei an dieser Stelle besonders für seine fachlichen Ratschläge gedankt.

Frau Dr. Susanne Mauel danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Ein sehr herzliches Dankeschön geht an meine Eltern. Sie standen hinter meiner beruflichen Entscheidung und haben mich immer tatkräftig unterstützt.

Nicht zuletzt danke ich besonders meinem Mann Mark für seine stetige Unterstützung und seine Liebe.

## SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Sabine Bischoff